

**Diagnostik von Extended Spectrum Beta-Lactamase-bildenden
Enterobakterien in Tier und Mensch**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Mohamed Ramadan Elmabruk El Jade

aus Bani Walid (Libyen)

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Exner

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.06.2017

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. Achim Hörauf

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Multiresistente Infektionserreger	7
1.2 β -Laktamasen.....	10
1.2.1 Einteilung der β -Laktamasen.....	11
1.2.2 Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBL)	13
1.2.3 AmpC.....	14
1.2.4 ESBL- und AmpC-Diagnostik	15
1.2.5 Therapiemöglichkeiten bei Infektionen durch ESBL-Bildner.....	16
1.2.6 Verbreitung ESBL-/AmpC- bildender Erreger beim Menschen	18
1.2.7 Verbreitung ESBL-/AmpC- bildender Erreger bei Nutztieren.....	22
1.3 Fragestellung.....	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Laborgeräte	26
2.2 Reagenzien und Materialien	27
2.3 Klinische Isolate.....	28
2.4 Phänotypische Methoden	30
2.4.1 Speziesidentifizierung.....	30
2.4.2 Resistenzbestimmung	31
2.5 Genotypisierung der ESBL	31
2.5.1 DNA-Isolierung	31
2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.5.3 Reverse Hybridisierung	35
2.6 Phänotypische Bestätigungstests.....	37
2.6.1 Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	37
2.6.2 AmpC & ESBL Detection Discs	38
2.6.3 ETEST® ESBL Ceftazidim (TZ) / Ceftazidim+Clavulansäure (TZL).....	39
2.6.4 β LACTA™-Test	41
3. Ergebnisse.....	42
3.1 Genotypisierung der ESBL-Stammkollektion	42

3.2	Evaluierung des VITEK®2-ESBL-Algorithmus	46
3.2.1	Bewertung des VITEK®2-ESBL-Bestätigungstests.....	49
3.3	Bewertung des Phoenix™100-ESBL-Bestätigungstests	50
3.4	Etablierung von chromID® ESBL	51
3.5	Evaluierung des β LACTA™-Tests als alternativer Schnelltest	51
4.	Diskussion	53
4.1	Der β LACTA™-Test reflektiert Cefotaxim- und Cefpodoxim-Resistenz	53
4.2	Der β LACTA™-Test ist zuverlässiger zum Nachweis von ESBL	56
4.3	Der β LACTA™-Test ist viel spezifischer als der chromID® ESBL-Agar	57
4.4	Der β LACTA™-Test ist spezifischer als ESBL-Bestätigungstest vom VITEK® 2 und Phoenix™ 100	58
4.5	Speziesspezifische Unterschiede in der ESBL-Detektion mit dem β LACTA™	59
4.6	Genotypisierung anhand des reversen Hybridisierungskits	63
4.7	Einsatzmöglichkeiten des β LACTA™-Tests	65
4.8	Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam als Carbapenem-Alternative gegen ESBL-positive <i>E.-coli</i> -Infektionen.....	66
5.	Zusammenfassung	70
6.	Anhang	72
6.1	Tabellenverzeichnis	82
6.2	Abbildungsverzeichnis	83
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

3GC	Cephalosporine der 3. Generation
AST	Antibiotic drug susceptibility testing
BL/BLIs	β -Laktam/ β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen
C.	<i>Citrobacter</i>
CA	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
CitFr	<i>Citrobacter freundii</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
E.	<i>Escherichia</i>
ESBL-E	Extended Spectrum Beta-Lactamase-bildende Enterobakterien
EA	<i>Enterobacter aerogenes</i>
EARS	Antimicrobial resistance interactive database
EC	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Center for Disease Control
ECLO	<i>Enterobacter cloacae</i>
EMA	European Medicines Agency
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Lactamases
EU	Europäische Union
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IMMIP	Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn
K.	<i>Klebsiella</i>
KC	<i>Kluyvera Cryocrescens</i>
Kl.	<i>Kluyvera</i>
KO	<i>Klebsiella oxytoca</i>
KP	<i>Klebsiella pneumonia</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -Carbapenemase

L	Liter
MBL	Metallo- β -Laktamasen
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
MM	<i>Morganella morganii</i>
MRE	Multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Zahl
n.a.	nicht auswertbar
NDM1	New Delhi Metallo-Beta-Laktamase
Pag	Pantoea agglomerans
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP/TAZO	Piperacillin/Tazobactam
PM	<i>Proteus mirabilis</i>
R	resistent
RKI	Robert Koch-Institut
S	sensibel
s	Sekunde(n)
SM	<i>Serratia marcescens</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
UKB	Universitätsklinikum Bonn
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	World Health Organization
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Multiresistente Infektionserreger

Antibiotika sind eine der wichtigsten therapeutischen Entdeckungen in der medizinischen Geschichte. Sie revolutionierten die Art, wie die Patienten mit bakteriellen Infektionen behandelt werden und trugen zur Verringerung der Mortalität und Morbidität von bakteriellen Erkrankungen bei. Sie sind auch ein wichtiges Instrument für die moderne Medizin und heute könnten übliche Verfahren wie Transplantation, Chemotherapie bei Krebserkrankungen und sogar die orthopädische Chirurgie ohne die Verfügbarkeit von wirksamen Antibiotika nicht erfolversprechend durchgeführt werden. Leider wurden Antibiotika in der Vergangenheit missbraucht. Sie wurden oft unnötig für virale Infektionen eingesetzt, gegen die sie keine Wirkung zeigen. Häufig werden Breitspektrum-Antibiotika verschrieben, wenn Diagnosen nicht genau gestellt werden bzw. der Infektionserreger unbekannt bleibt. Meistens finden demnach Antibiotika Anwendung, die die normale Körperflora angreifen und nicht gezielt nur die Bakterien, die für die Krankheit verantwortlich sind, abtöten.

Der Missbrauch von Antibiotika führt zu der Entstehung und Selektion resistenter Bakterien. Ärzte weltweit geraten inzwischen immer wieder in Situationen, in denen infizierte Patienten nicht adäquat antibiotisch behandelt werden können, weil verantwortliche Bakterium resistent gegen viele der verfügbaren Antibiotika ist (WHO, 2014). Multiresistente Erreger (MRE) sind folglich Bakterien, die gegen zahlreiche Antibiotikaklassen resistent sind, was bedeutet, dass viele Antibiotika bei einer Infektion mit diesen Bakterien nicht mehr wirksam sind.

Die weltweite Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen gehört nach Einschätzung der WHO zu den größten Gefahren für die menschliche Gesundheit. Das European Center for Disease Control (ECDC) und die European Medicines Agency (EMA) geben an, dass jährlich ca. 25.000 Patienten in der EU an einer Infektion mit MRE sterben und jährliche finanzielle Verluste von über 1,5 Milliarden Euro verursachen. Weiterhin verlängern sie die Verweildauer von Patienten im Krankenhaus um 2,5 Millionen Tage pro Jahr (ECDC/EMA, 2009).

Mittelfristig ist keine Lösung des Problems zu erwarten, denn zurzeit befinden sich nur wenige neue Antibiotika in der klinischen Prüfung. Außerdem schreitet die Resistenzausbreitung durch die inadäquate Anwendung vorhandener Antibiotika rasant

voran (ECDC/EMEA, 2009). Hierzu gibt es viele alarmierende Beispiele von zunehmender Antibiotikaresistenz in Bakterien, die häufig gesunde Personen und Patienten innerhalb und außerhalb der Gesundheitseinrichtungen infizieren. Unter den Gram-positiven Bakterien erregt der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) die Aufmerksamkeit der Medien und von Public Policy (Boucher et al., 2010). Einige MRSA-Stämme haben zudem eine beunruhigende Tendenz zur Entwicklung einer zusätzlichen Resistenz gegen Glycopeptidantibiotika und einige der neu eingeführten Substanzen, wie z.B. Daptomycin und Oxazolidinone gezeigt (van Hal et al., 2011). Ambulant erworbene MRSA-Stämme haben sich weltweit verbreitet und werden zunehmend auch in den Kliniken und Altenheimen nachgewiesen. Andererseits erregen auch Glycopeptid-resistente Enterokokken Besorgnis in vielen Ländern, und die Entstehung weiterer Resistenzmechanismen ist unabwendbar (Johnson et al., 2010).

Das Resistenzproblem ist bei den Gram-negativen Bakterien heute klinisch als noch schlimmer zu bewerten als die Resistenzen bei den Gram-positiven Erregern. Resistente Gram-negative Bakterien finden sich sowohl in der Normalbevölkerung als auch in den Krankenhäusern. Gonokokken, die bis vor kurzem mit Standardantibiotika behandelt wurden, werden immer resistenter gegen Fluorchinolone und Cephalosporine (Chisholm et al., 2010). Viele Salmonella-Stämme haben ebenfalls Resistenzen gegen diverse Antibiotika gebildet. Diese erschweren die Behandlung insbesondere in Ländern, in denen der Zugang zu noch wirksamen Antibiotika begrenzt ist (Uma et al., 2010). Auch die steigenden Resistenzraten in *Enterobacteriaceae*, wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* erschweren die Behandlung ambulant-erworbener Infektionen immer häufiger (Wang et al., 2015). Obwohl die Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation in *E. coli* in vielen europäischen Ländern immer noch unter 10 % liegt, ist sie in anderen erheblich gestiegen, zum Teil um mehr als 25% und sogar bis zu 50 % in Bakterienisolaten aus invasiven Infektionen (ECDC, 2015).

In den Gesundheitseinrichtungen hat die Multiresistenz bei Gram-negativen bakteriellen Infektionen die Behandlungsmöglichkeiten stark eingeschränkt und manchmal stehen auch in wohlhabenden Ländern keine wirksamen Substanzen mehr zur Verfügung, um lebensbedrohliche Infektionen zu behandeln (Koo et al., 2010). Zum Beispiel kann eine empirische Therapie mit Cephalosporinen in vielen Ländern nicht länger als Standard verwendet werden. Daher werden zunehmend Carbapeneme, eine Antibiotikaklasse, die

häufig die letzte verfügbare Waffe gegen viele Gram-negative Bakterien darstellt, zunehmend für die empirische Therapie eingesetzt. Als direkte Folge wird die Resistenzentstehung gegen diese Substanzen beschleunigt, wenn Carbapeneme weltweit zum Standard in der First-Line-Therapie werden. In einigen Ländern ist dieses, insbesondere auf der Intensivstation, wo Selektionsdruck und Übertragungsrisiken am höchsten sind, bereits der Fall. *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter*-Spezies können sehr resistent gegen Ceftazidim, Fluorchinolone und Carbapeneme sein. Eine zunehmende Anzahl von diesen Nonfermentern sind zudem gegen alle Antibiotika, einschließlich Colistin, resistent (Koo et al., 2010). Auch ist es absehbar, dass *K. pneumoniae* und *E. coli* zunehmend resistent gegen Carbapeneme werden, ein Wirkverlust der bei diesen Spezies fast immer durch die Bildung von Carbapenemasen oder Metallo-Beta-Laktamasen, wie die New Delhi Metallo-Beta-Laktamase (NDM1) (Kumarasamy et al., 2010), vermittelt wird (ECDC, 2016).

Einige Antibiotikaresistenzen bei *Enterobacteriaceae* stammen auch aus dem Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung und in der Lebensmittelproduktion. Gegen Fluorchinolone- und 3. Generation Cephalosporine-resistente *E.-coli*- und Salmonellen-Stämme werden häufig mit Fleisch- und Geflügelprodukten in Verbindung gebracht (Li et al., 2010). Die nicht-therapeutische Verwendung von Antibiotika in der Tiermast nimmt trotz der Empfehlungen der WHO, diese Praxis - wie in der EU bereits geschehen - zu stoppen, weltweit weiter zu (Li et al., 2010).

1.2 β -Laktamasen

Penicilline und Cephalosporine gehören zu den am häufigsten verwendeten antibiotischen Substanzen in der Human- und Veterinärmedizin. Trotz der Verfügbarkeit alternativer Antibiotikaklassen sind die Beta-Laktame aufgrund ihrer exzellenten Wirksamkeit bis heute Substanzen der ersten Wahl. Allerdings hat der weitverbreitete Einsatz von Beta-Laktamen zur Entstehung von Beta-Laktam-Resistenz sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien geführt. Enzyme, sogenannte " β -Laktamasen", spalten den β -Laktam-Ring durch Hydrolyse und verhindern dadurch seine Aktivität, beispielsweise die Blockade der für das Bakterienwachstum essentiellen Transpeptidase („Penicillin-Bindeprotein"; PBP) in der Peptidoglykanschicht der Zellwand. Im Laufe der Evolution haben darüber hinaus Punktmutationen in den β -Laktamase-Genen die aktive Domäne des Enzyms verändert und das Substratspektrum erweitert. Die dadurch entstandenen ***Extended-Spectrum-Beta-Lactamases*** (ESBL) sind nicht nur in der Lage, Schmalspektrum-Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine der ersten und zweiten Generation zu hydrolysieren, sondern auch Breitspektrum-Antibiotika, wie z.B. Aztreonam und Cephalosporine der dritten, vierten und fünften Generation (Wiegand, 2003). Die Ausbreitung dieser Enzyme wird durch ihre Kodierung auf Plasmiden erleichtert und stellt die Hauptursache für die steigenden Resistenzraten gegenüber Breitspektrum β -Laktam-Antibiotika in *Enterobacteriaceae* dar. Therapieversagen der Initialtherapie durch die Produktion von ESBL ist mit verlängerten Krankenhausaufenthalten, höherer Patientensterblichkeit und erhöhten medizinischen Kosten verbunden (Leistner et al., 2014).

Die routinemäßig für den Nachweis von ESBL in klinischen Isolaten verwendeten Verfahren basieren meist auf der phänotypischen Diagnose von ESBL unter Anwendung der Bakterienkultur in An- oder Abwesenheit von Antibiotika. Dazu gehören selektive Kulturmedien, ESBL-Screening-Algorithmen in der automatisierten Empfindlichkeitstestung wie z.B. in VITEK[®]- oder Phoenix[™]-Automaten und Bestätigungstests mit chromogenen Spezialagars oder E-Test-Streifen, die Beta-Laktam-Antibiotika mit und ohne Zusatz von Beta-Laktamase-Inhibitoren enthalten (Thomson, 2010). Obwohl der genetische Nachweis von ESBL auf den ersten Blick sehr überzeugend erscheint, benutzt die Mehrheit der mikrobiologischen Laboratorien wegen der hohen Kosten und der nur wenigen zur Verfügung stehenden CE-zertifizierten

kommerziellen Systeme die molekularen Tests nicht routinemäßig für ESBL-Erkennung, zumal diese Tests aufgrund der Vielfältigkeit der ESBL-Enzyme meistens eine ESBL-Aktivität nicht ausschließen können. Dennoch sind wegen der Gefahr von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen bei dem automatisierten ESBL-Screening Bestätigungstests erforderlich, was zeitaufwendig und teuer ist.

1.2.1 Einteilung der β -Laktamasen

Die Einteilung der β -Laktamasen erfolgt hauptsächlich nach zwei Klassifizierungssystemen: der Ambler- und der Bush-Jacoby-Mederos-Klassifikation.

1.2.1.1 Ambler-Klassifikation

Bei der Ambler-Klassifikation handelt es sich um ein molekulares Klassifizierungssystem, das auf Unterschieden in der Aminosäuresequenz basiert. Ambler teilte die β -Laktamasen in vier Hauptgruppen (A bis D) ein. Die Klassen A, C und D sind Serin- β -Laktamasen. Diese Enzyme haben einen Serylrest im katalytischen Zentrum, der die Spaltung des β -Laktam-Rings der Antibiotika bewirkt. Die Klasse B umfasst Metallo- β -Laktamasen, welche Zinkionen im katalytischen Zentrum enthalten (Abb. 1).

ESBL und AmpC sind die von *Enterobacteriaceae* am häufigsten produzierten β -Laktamasen und gehören beide zu den Serin- β -Laktamasen nach dem Ambler-Schema. Der breite Einsatz von Aminopenicillinen und Cephalosporinen der ersten bzw. zweiten Generation führte bereits Mitte der 1960er Jahre zur Verbreitung der TEM-1- und SHV-1- β -Laktamasen (non-ESBL) (Datta and Kontomichalou, 1965). Die 1978 beginnende Anwendung von Cephalosporinen der dritten und vierten Generation hatte Ende der 1980er Jahre die Entstehung der TEM- und SHV-ESBL zur Folge (Kliebe et al., 1985; Knothe et al., 1983). Seit den 1990er Jahren gewinnen CTX-M-ESBL- sowie AmpC- β -Laktamasen zunehmend an Bedeutung (Bonnet, 2004; Philippon et al., 2002). Inzwischen wurden ca. 150 TEM-, 88 SHV-, 65 CTX-M-Typen sowie eine Vielzahl von AmpC-Varianten beschrieben.

Obwohl ein struktureller Ansatz wie die Ambler-Klassifikation das einfachste und am wenigsten kontroverse Prinzip für die Klassifizierung einer so vielfältigen Reihe von Enzymen wäre, bietet eine funktionelle Klassifikation die Möglichkeit, diese vielfältigen Enzyme in Hinblick auf ihre phänotypischen Merkmale (Substratprofil und Hemmbarkeit

durch β -Laktamase-Inhibitoren) zusammenzufassen (Bush et al., 1995).

1.2.1.2 Bush-Jacoby-Medieros-Klassifizierung

Die Bush-Jacoby-Medieros-Klassifizierung ist ein funktionelles Klassifizierungssystem und beruht auf der funktionellen Unterscheidung der β -Laktamasen. Dabei werden drei Hauptgruppen und mehrere Untergruppen unterschieden. Die Zuordnung zu einer der Gruppen beruht auf ihrer Fähigkeit, bestimmte β -Laktam-Klassen zu hydrolysieren, und auf ihrer Empfindlichkeit gegenüber den β -Laktamase-Inhibitoren Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam (Bush et al., 1995).

Gruppe-1-Enzyme sind die Cephalosporinasen (wirken bevorzugt gegen Cephalosporine) und gehören zur Ambler-Klasse C. Sie werden nicht durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt. Gruppe 2 gehört zu Ambler-Klassen A und D und ist die größte Gruppe der β -Laktamasen. Die dazugehörigen Penicillinasen, Cephalosporinasen und ESBL der Gruppe 2 sind durch β -Laktamase-Inhibitoren inhibierbar. Die Gruppe 3 umfasst die Metallo- β -Laktamasen. Sie werden nicht durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt und zeichnen sich durch die Hemmbarkeit durch Metallion-Chelatkomplexe wie EDTA aus.

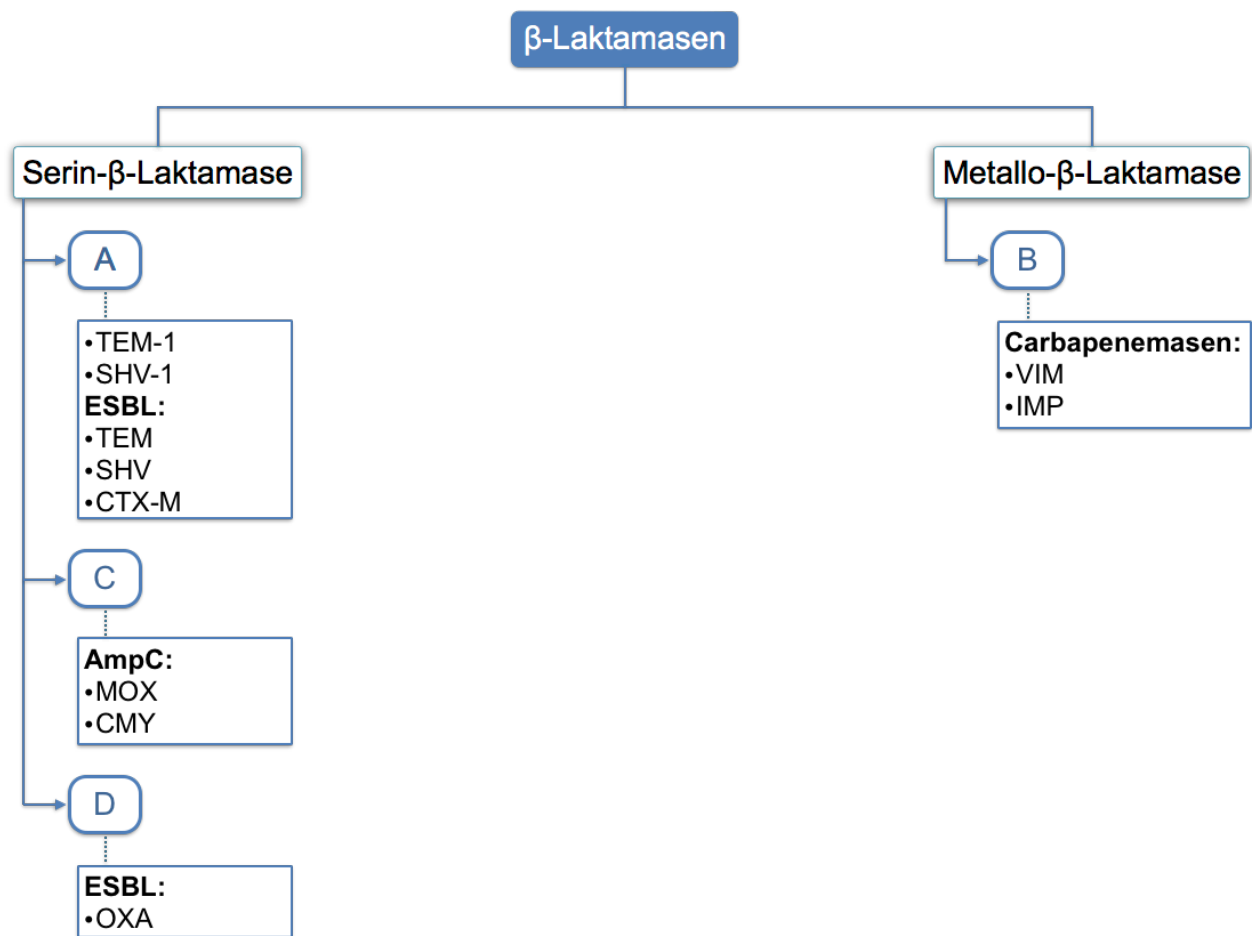


Abb. 1: Die Einteilung der β-Laktamasen nach dem Ambler-Schema. Ambler teilte die β-Laktamasen in vier Hauptgruppen (A bis D) ein. Er unterschied ferner zwischen β-Laktamasen mit Serin- oder Zinkionen im katalytischen Zentrum.

1.2.2 Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBL)

ESBL sind Enzyme, die in der Lage sind, die meisten Penicilline und Cephalosporine, einschließlich Oxyimino-β-Laktam-Verbindungen (Cefuroxim, Cephalosporine der dritten und vierten Generation und Aztreonam) zu hydrolysieren, sind aber ohne Wirkung bei Cephamycinen und Carbapenemen. Die meisten ESBL gehören zu den β-Laktamasen der Klasse A nach dem Ambler-Schema, die von β-Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam) hemmbar sind.

Die ersten ESBL-produzierenden Stämme wurden im Jahr 1983 identifiziert und werden seitdem weltweit beobachtet. Diese Verbreitung ist auf die klonale Expansion von Produktionsorganismen, die horizontale Übertragung von ESBL-Genen und ihre *de-novo*-Entstehung zurückzuführen. Die mit Abstand wichtigsten ESBL-Gruppen sind CTX-M-, gefolgt von SHV- und TEM-Enzymen. Bestimmte Oxacillinasen werden auch zu den ESBL gerechnet.

ESBL-Bildung wurde vor allem in *Enterobacteriaceae* beobachtet, zuerst in der Krankenhausumgebung, später in Pflegeheimen und seit etwa 2000 in der Allgemeinbevölkerung (ambulante Patienten, gesunde Träger) und der Lebensmittelkette (kranke und gesunde Tiere, tierische und pflanzliche Lebensmittel). Die am häufigsten auftretenden ESBL-produzierenden Spezies sind *E. coli* und *K. pneumoniae*. Jedoch sind alle anderen klinisch relevanten *Enterobacteriaceae*-Arten ebenfalls ESBL-Produzenten. Die Prävalenz von ESBL-positiven Isolaten hängt von einer Reihe Faktoren, einschließlich Spezies, geographische Lage, Klinik/Abteilung, Patientengruppe und Art der Infektion ab.

Meistens sind die ESBL-Gene in ein Integron eingebettet. Diese Gene können mithilfe von mobilen Strukturen, wie Insertionssequenzen (IS-Elemente) oder Transposons, mobilisiert und über konjugative Plasmide übertragen werden. Mehrere Transposons mit Genen, die Resistenz gegenüber unterschiedlichen Antibiotikaklassen vermitteln, können in einem Plasmid enthalten sein. Das wird als sog. *Multidrug resistance region* bezeichnet. Die gekoppelte Übertragung dieser Mehrfachresistenz-Transposons auf andere Spezies führt zur Entstehung von multiresistenten Erregern, die bei Infektionen mit verlängerten Krankenhausaufenthalten, höherer Patientensterblichkeit und erhöhten medizinischen Kosten verbunden sind (Ambler, 1980; Paterson, 2006; Wiegand, 2003).

1.2.3 AmpC

AmpC sind Ambler-Klasse-C- β -Laktamasen. Sie hydrolysieren Penicilline, Cephalosporine (einschließlich der dritten Generation, aber in der Regel nicht die der vierten Generation) und Monobactame. Im Allgemeinen sind AmpC-Enzyme mit β -Laktamase-Inhibitoren schlecht hemmbar, insbesondere mit Clavulansäure.

Die ersten AmpC-bildenden Isolate wurden Ende der 1980er Jahre erkannt und sind seitdem weltweit infolge der klonalen Ausbreitung der AmpC-tragenden Stämme, horizontaler Genübertragung und durch *de-novo*-Entstehung verbreitet. Es gibt mehrere

Linien mobiler AmpC-Gene, die von natürlichen Produzenten stammen, nämlich die *Enterobacter*-Gruppe (MIR, ACT), die *C. freundii*-Gruppe (CMY-2-like, LAT, CFE), die *M.-morganii*-Gruppe (DHA), die *Hafnia-alvei*-Gruppe (ACC), die *Aeromonas*-Gruppe (CMY-1-like, FOX, MOX) und die *Acinetobacter-baumannii*-Gruppe (ABA). Die häufigsten und am weitesten verbreiteten sind die CMY-2-like-Enzyme, obwohl die induzierbaren DHA-like β -Laktamasen und einige andere auch weit verbreitet sind.

Die wichtigsten Produzenten der erworbenen AmpC-Resistenzgene sind *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* und *Proteus mirabilis*.

Obwohl die erworbenen AmpC weit verbreitet sind und in multizentrischen Studien enterobakterielle Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation beschrieben wurde, ist ihre Häufigkeit weit unter der von ESBL geblieben. Jedoch könnte unter bestimmten lokalen und speziellen epidemiologischen Gegebenheiten die Bedeutung von Organismen, die diese Enzyme bilden, wesentlich steigen (Paterson, 2006; Philippon et al., 2002).

1.2.4 ESBL- und AmpC-Diagnostik

Die Hemmbarkeit von ESBL durch β -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure oder Sulbactam, wird für die phänotypische Identifikation genutzt. Die phänotypische Resistenzbestimmung für drei 3. Generation Cephalosporine – Cefotaxim, Ceftazidim und Cefpodoxim – jeweils mit und ohne β -Laktamase-Inhibitor wird im Mikrobouillonverdünnungstest durchgeführt. Phänotypisch galt die ESBL-Bildung als nachgewiesen, wenn eine Resistenz gegenüber Cefpodoxim sowie Cefotaxim und/oder Ceftazidim und eine Hemmung durch Sulbactam oder Clavulansäure ($\text{MHK}_{\text{Cephalosporin}}/\text{MHK}_{\text{Cephalosporin+Inhibitor}} \geq 8$) nachgewiesen wurde. Bestimmte *Klebsiella spp.*, die sog. K1-Hyperproduzenten, haben ein ähnliches Resistenzspektrum wie ESBL-Bildner. Diese chromosomal-kodierte K1- β -Laktamase ist durch β -Laktamase-Inhibitoren nicht hemmbar (Wiegand, 2003).

Ein für die phänotypische Identifikation genutztes Merkmal der AmpC-Bildner ist ihre Resistenz gegenüber Cefoxitin. Zusätzlich ist die nicht oder nur gering durch Inhibitoren hemmbare 3. Generation Cephalosporin-Resistenz für Plasmid-vermittelte AmpC, dereprimierte AmpC, oder überexprimierte chromosomal-kodierte *E.-coli*-AmpC- β -Laktamasen charakteristisch (Wiegand, 2003) (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Phänotypische Merkmale unterschiedlicher β -Laktamasen.

R = Resistent, V = Variabel, S = Sensitiv, AP = Aminopenicilline, CTX = Cefotaxim, CAZ = Ceftazidim, CPD = Cefpodoxim, FOX = Cefoxitin, SUL = Sulbactam, CLV = Clavulansäure

β -Laktamase	AP	CPD	CTX	CAZ	FOX	Hemmbarkeit durch β -Laktamase-Inhibitoren
TEM-ESBL	R	R	V	R	S	+
SHV-ESBL	R	R	V	R	S	+
CTX-M-ESBL	R	R	R	V	S	+
K1	R	R	V	S	S	-
AmpC	R	R	R	R	R	-

Die genaue Differenzierung ermöglichen erst molekulare Analysen verschiedener ESBL oder AmpC- β -Laktamasen, trotzdem benutzen die meisten mikrobiologischen Laboratorien wegen der hohen Kosten und dem Arbeitsaufwand die molekularen Tests nicht routinemäßig für ESBL-Erkennung. Die Amplifikation und die Sequenzierung der häufigen ESBL-Resistenzgene (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) erfolgen mittels ESBL-Multiplex-PCR. Mehrere Multiplex-PCR-Primer wurden für den schnellen Nachweis der drei größten Gruppen der CTX-M-Familie entwickelt. In Konjugationsexperimenten wurde geprüft, ob diese Resistenzdeterminanten übertragbar sind. Eine AmpC-Multiplex-PCR bietet die Möglichkeit, *AmpC*-Gene der sechs größten AmpC-Cluster zu amplifizieren (RKI, 2007).

1.2.5 Therapiemöglichkeiten bei Infektionen durch ESBL-Bildner

Es ist zu bedenken, dass viele ESBL-Bildner nicht nur gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika resistent sind, sondern häufig Multiresistenzen auch gegen andere Antibiotikaklassen aufweisen.

Mittel der Wahl sind Carbapeneme. Auch Tigecyclin sowie Colistin/Polymyxin sind wirksam. Die Carbapeneme werden nach der Paul-Ehrlich-Gesellschaft in zwei Gruppen eingeteilt. Zu den Carbapenemen der Gruppe 1 gehören Imipenem, Meropenem und Doripenem, die gegen *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* und Enterokokken aktiv sind. Aber Ertapenem, ein Carbapenem der Gruppe 2, wirkt nicht gegen diese Keime und kann deshalb bevorzugt bei Infektionen eingesetzt werden, bei denen diese Erreger nicht vorkommen. Außerdem wirkt Ertapenem gegenüber *Enterobacter cloacae*,

Escherichia coli und *Klebsiella pneumoniae* sehr viel stärker als die der Carbapeneme der Gruppe 1. Bei Ertapenem reicht wegen einer Plasmahalbwertszeit von ca. vier Stunden eine einzige tägliche Gabe aus. Die Wirkungsweise von Ertapenem ist rasch bakterizid (Collins et al., 2012).

Eine Längsschnittstudie zeigte, dass der Einsatz von Imipenem/Meropenem zu einem Anstieg der Inzidenz Imipenem-resistenter *Pseudomonas-aeruginosa*-Stämme um 3,8 % jährlich führte. Während der Einsatz von Ertapenem weder mit einem Anstieg noch mit einer größeren Inzidenz Imipenem-resistenter *Pseudomonas-aeruginosa*-Stämme korreliert (Carmeli, 2011).

In letzter Zeit haben sowohl EUCAST- (2009) als auch CLSI-Richtlinien (2010) auf das Paradigma eingeschaltet, dass die erzielten Ergebnisse in den Sensibilitätstests für Beta-Laktam-Antibiotika berichtet werden wie im mikrobiologischen Labor gemessen wurden (Leclercq et al., 2013). Die frühere Interpretationshaltung korrigiert alle Cephalosporine, die sensibel getestet wurden, zu resistent, wenn das Isolat für ESBL positiv getestet wurde. Mit den neu definierten unteren und sensitiveren Grenzwerten ist dies nicht mehr als notwendig angesehen.

Es ist jedoch eine fortlaufende Angelegenheit von intensiven Debatten, ob das Vorhandensein von ESBL zu *in-vivo*-Unwirksamkeit gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation führt, trotz *in-vitro*-Sensibilität der infizierenden Stämme. Dennoch könnte das Vertrauen auf die Ergebnisse der *in-vitro*-Sensibilität neue Therapiemöglichkeiten eröffnen und den Einsatz von Breitspektrum-Reserveantibiotika wie Carbapenemen reduzieren. In Hinblick auf die rasche Entstehung von Carbapenemasen ist jede therapeutische Alternative eine Option, die unter ernsthaften Überlegungen getroffen werden sollte.

Cefepim war vor der 2009/2010-Ära eine inakzeptable Behandlungsoption bei ESBL-Infektionen. Nguyn et. al zeigten, dass die Standarddosis Cefepim eine vernünftige Carbapenem-Alternative für die definitive Therapie von invasiven Infektionen durch ESBL-produzierende *E. coli* und *Klebsiella spp.* ist, wenn die MHK für den Organismus ≤ 2 mg/L (CLSI) oder ≤ 1 mg / L (EUCAST) ist, obwohl höhere Dosen für MHKs im 4-8 mg/L-Bereich in Betracht gezogen werden könnten (Nguyen et al., 2014).

Auch β -Laktam/ β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen (BL/BLI) wie Piperacillin/Tazobactam stellen eine gute Carbapenem-Alternative dar. Eine

Metaanalyse von Vardakas et al. verglich Carbapeneme mit BL/BLIs für sowohl die empirische Verwendung (Carbapeneme in 317 gegen BL/BLIs in 273 Patienten) als auch die definitive Verwendung (Carbapeneme in 398 gegen BL/BLIs in 118 Patienten) bei einer durch ESBL-Bildner verursachte Bakteriämie. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Mortalität sowohl für die empirische (RR 0,91, 95% CI 0,66-1,25, P = 0,56) als auch für die definitive (RR 0,52, 95% CI 0,23-1,13, P = 0,10) Therapie. Jedoch wurde die Aussagekraft der Meta-Analyse durch in den Studien eingeschlossene beträchtliche Heterogenität begrenzt, und durch die Tatsache, dass niemand angeregt wurde, eine Ergebnis-Differenz zu erkennen, und durch die Tatsache, dass bei mehr schwerkranken Patienten eher Carbapeneme vorgeschrieben wurden (Vardakas et al., 2012).

Offensichtlich muss bei therapeutischen Entscheidungen bezüglich *in-vitro*-Tests notwendige Vorsicht gelten, bis klinische Studien hinreichende Beweise für die Wirksamkeit von Carbapenem-Alternativen bei Infektionen mit ESBL-E liefern. Es ist daher eine wichtige Aufgabe für die Mikrobiologie, so viele Informationen wie möglich zur Verfügung zu stellen, d.h. ESBL-Prüfung verdächtiger Isolate durchführen. Da die derzeit verwendeten Routineverfahren zusätzliche 18-24 Stunden erfordern, um eine eindeutige Diagnose von ESBL-Aktivität zu stellen, ist die Entwicklung schneller Verfahren für eine zuverlässige Vorhersage von ESBL-Aktivität eine diagnostische Herausforderung und eine therapeutische Priorität.

1.2.6 Verbreitung ESBL-/AmpC- bildender Erreger beim Menschen

In den letzten Jahren nahmen die Resistenzen gegen Cephalosporine der dritten Generation bei *E.-coli*- und *K.-pneumoniae*-Isolaten von Menschen in Europa (Europäische Union, Island und Norwegen) zu. Das gleiche gilt für Deutschland, denn hier kann beim Menschen eine kontinuierliche Zunahme der Resistenzen verzeichnet werden (Abb. 2). Deutschland ist im Jahr 2014 mit einer Resistenzrate von ca. 10,5 % bzw. 12,7 % gegen Cephalosporine der dritten Generation bei *E. coli* und *K. pneumoniae* im europäischen Mittelfeld, während in Skandinavien und in den Niederlanden niedrigere Resistenzraten von 5-7 % bzw. 2-6 % und in einigen südosteuropäischen Ländern (z.B. Bulgarien) Resistenzraten von bis zu ca. 40,4 % bzw. 74,8 % beobachtet wurden. Der Anteil der ESBL-positiven Isolate lag zwischen 71,1 % und 100 %, wobei die meisten Länder Anteile von über 90 % meldeten (ECDC, 2015).

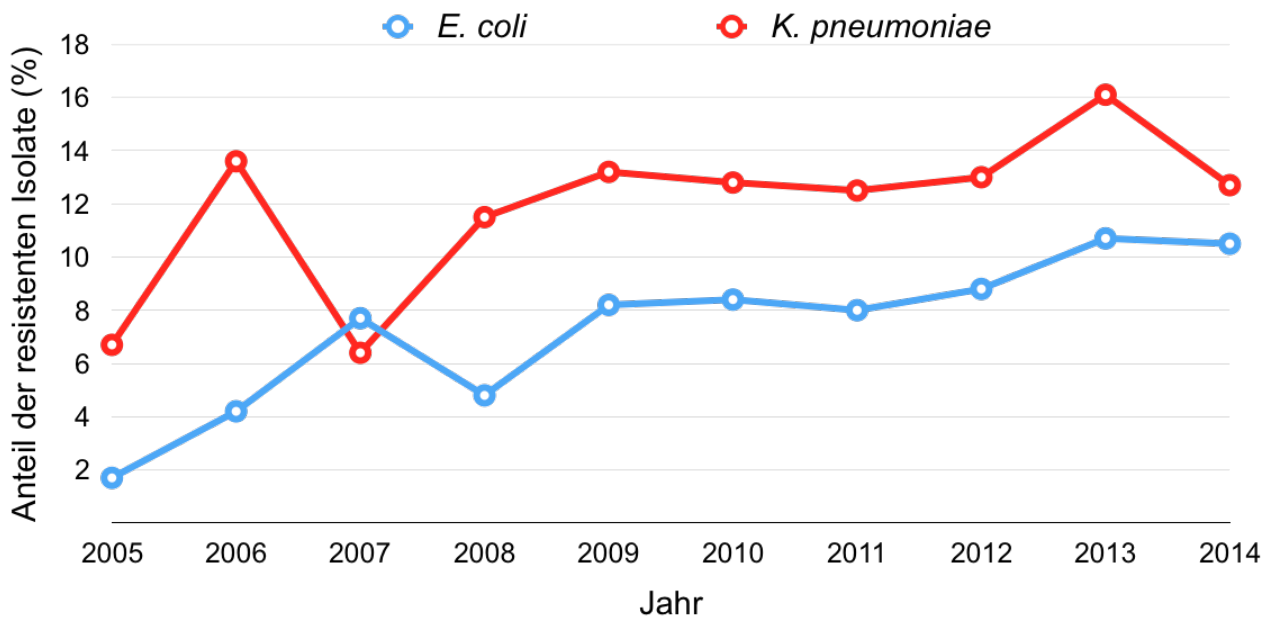


Abb. 2: Resistenzrate gegen Cephalosporine der dritten Generation bei *E. coli* und *K. pneumoniae* in Deutschland im Zeitraum 2005-2014 (ECDC, 2015).

In verschiedenen Studien am Robert Koch-Institut (RKI) wurden zur Bestimmung der Häufigkeit und geografischen Verteilung von ESBL in Deutschland repräsentative Stichproben von phänotypisch ESBL-positiven *E.-coli*- bzw. *K.-pneumoniae*-Isolaten untersucht. Aus über ganz Deutschland verteilte Kliniken wurden im Jahr 2004 überwiegend nosokomiale *E. coli* durch den Laborverbund Limbach gesammelt. Im Jahr 2008 erfolgte eine weitere Untersuchung, die 152 ESBL-positive *E.-coli*- (150 Kliniken) und 65 ESBL-tragende *Klebsiella-spp.*-Isolate (56 Kliniken) aus den am ARS-Projekt beteiligten Krankenhäusern einschloss. Im Rahmen des RESET-Forschungsverbundes im Jahr 2011 wurden je 70 ESBL-bildende nosokomiale sowie ambulante (Patient hatte mindestens sechs Monate keinen Krankenhausaufenthalt) *E.-coli*-Isolate durch den Laborverbund Limbach gesammelt und zur molekularen Untersuchung eingesandt. Im RKI erfolgte die PCR für verschiedene β -Laktamase-Gene (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) und deren Sequenzierung. In den Ergebnissen der Analysen lag zu allen Zeitpunkten eine eindeutige Dominanz der CTX-M-Enzyme sowohl in *E. coli* als auch in *K. pneumoniae* vor. Insbesondere CTX-M-15 stellte bis 2011 ca. die Hälfte aller nachgewiesenen ESBL in nosokomialen *E. coli* dar (Tab. 2). Aber auch der Anteil der Variante CTX-M-1 war mit über 30 % sehr hoch. Das CTX-M-1-Enzym wurde auch in Studien mit veterinärmedizinischen Isolaten im RESET-Verbundprojekt häufig gefunden (Hille et al., 2014; Sharp et al., 2014), während CTX-M-15 überwiegend bei humanen

Isolaten beobachtet wurde (Sharp et al., 2014). Die ESBL-Gene liegen meistens auf Plasmiden, die leicht innerhalb einer Spezies und zwischen verschiedenen Spezies übertragen werden können. Weitere detailliertere Untersuchungen der ESBL-Gen-tragenden Plasmide und ein Vergleich von *E.-coli*-Isolaten der human- und veterinärmedizinischen Studien des RESET-Verbundes erfolgen derzeit mit dem Ziel, mehr über das Ausmaß des Transfers ESBL-bildender Stämme oder ESBL-Gen-tragender Plasmide aus verschiedenen Quellen (Mensch, Tier, Nahrungsmittel, Umwelt) zu erfahren (Pfeifer and Eller, 2012).

Tab. 2: Häufigkeit der verschiedenen ESBL-Varianten bei deutschlandweit gesammelten nosokomialen *E. coli* in den Jahren 2004, 2008 und 2011 (Pfeifer and Eller, 2012). ^aNosokomiale *E. coli* ^bLimbach-Laborstudie ^cARS-ESBL-Studie ^dRESET.

	2004 ^b	2008 ^c	2011 ^d
<i>E.-coli</i>-Isolate^a	n=49	n=152	n=70
TEM-ESBL	n=7	n=6	n=2
SHV-ESBL	n=2	n=3	n=1
CTX-M-ESBL	n=40 (81,6 %)	n=143 (94,1 %)	n=67 (95,7 %)
CTX-M-15	n=11 (27,5 %)	n=76 (53,1 %)	n=33 (49,2 %)
CTX-M-1	n=10 (25 %)	n=50 (35 %)	n=26 (38,8 %)

Mit Ausnahme von *E. coli* und *K. pneumoniae* wurden ESBL bis heute in nahezu allen Gram-negativen Spezies nachgewiesen. Die Untersuchungen eingesandter Isolate am RKI deuteten darauf hin, dass ESBL auch in weniger häufig auftretenden nosokomialen Infektionserregern wie in *Proteus mirabilis* und *Providencia spp.* identifizierbar sind. Dabei handelte sich jedoch zumeist um weniger bekannte ESBL-Typen wie CTX-M-55, TEM-92 und VEB-1. In *K. oxytoca*, *Enterobacter spp.* und *Citrobacter spp.* wurden zumeist die auch in *E. coli* häufigen Varianten CTX-M-1, CTX-M-15 und CTX-M-14 nachgewiesen. Mehrheitlich ist die Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten und vierten Generation bei *Enterobacter spp.* und *Citrobacter spp.* aber meistens eine Folge der Überexpression der spezieeigenen AmpC- β -Laktamase, sowie bei *K. oxytoca* die Folge der Überexpression der K1(OXY)- β -Laktamase. Eine Ausnahmeerscheinung ist bisher noch die ESBL-Bildung in Nonfermentern wie *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa*, da diese Spezies durch

andere Mechanismen, wie die Überexpression von Effluxpumpen oder spezieeigener β -Laktamasen von Natur aus resistent gegenüber vielen Antibiotika sind und damit unter Therapie schnell resistent werden (Poole, 2004). Die in *Enterobacteriaceae* sehr selten vorkommenden ESBL-Enzyme PER, GES, VEB wurden in beiden Spezies beschrieben (Livermore and Woodford, 2006). In Deutschland wurden diese ESBL in *P. aeruginosa* und *A. baumannii* bisher nur in Einzelfällen nachgewiesen. Zumeist waren die Patienten in diesen Fällen zuvor im Ausland hospitalisiert und brachten den multiresistenten Keim mit.

Im Jahr 2007 wurden am RKI im Rahmen eines über das Bundesministerium für Gesundheit (BMG) geförderten Projektes die molekularen Grundlagen der zunehmenden Resistenz von Enterobakterien gegen moderne Beta-Laktam-Antibiotika an 163 *Enterobacteriaceae* untersucht. Dabei waren 91 der 163 Isolate *E. coli*, 37 *K. pneumoniae*, 33 *K. oxytoca*, acht *E. cloacae*, zwei *E. aerogenes*, zwei *C. freundii* und eines *P. stuartii*.

Die Isolate wurden aus 72 bundesweit verschiedenen Kliniken, überwiegend aus dem südwestlichen Teil des Landes, zur Verfügung gestellt. Die meisten Isolate stammten von Blut- (71 %) sowie Urinkulturen (21 %). Die übrigen Stämme wurden aus Sputum, Trachealsekret, Wundinfektionsproben und Stuhlproben isoliert sowie vier Isolate aus ambulanten Einrichtungen (unkomplizierte Harnwegsinfektionen).

Phänotypisch waren die meisten untersuchten Isolate nicht nur gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika resistent. Bei 72 % der phänotypischen ESBL-Isolate wurde im Mikrobouillonverdünnungstest, neben der Cephalosporin-Resistenz, auch eine Resistenz gegenüber Fluorochinolonen gemessen. Weitere 39 Isolate waren zusätzlich gegenüber anderen Antibiotika-Klassen resistent (Multiresistenz). Die Mehrheit (67 %) dieser 39 multiresistenten Stämme gehörte der Spezies *E. coli* (n=26) an. Daneben wurden acht *K. pneumoniae*, zwei *K. oxytoca*, zwei *Enterobacter cloacae* sowie ein *Providencia stuartii* als multiresistent nachgewiesen.

Die Multiresistenz beruht meist auf dem horizontalen Gentransfer über konjugative Plasmide, wie es in verschiedenen Konjugationsexperimenten gezeigt werden konnte.

Genotypisch wurden ESBL-Gene in den Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *E. cloacae* nachgewiesen. Charakterisiert wurden vier verschiedene TEM-ESBL, fünf SHV-ESBL und sieben CTX-M-Typen. 49 Isolate enthielten jeweils ein Beta-Laktamase-

(bla-)Gen (blaTEM, n = 22; blaSHV, n = 13; blaCTX-M, n = 14). Weitere 63 Isolate enthielten jeweils zwei *bla*-Gene (blaTEM + blaSHV, n = 24; blaTEM + blaCTX-M, n = 29; blaSHV + blaCTX-M, n = 10). Außerdem wurden in einem *K.-pneumoniae*-Isolat drei bla-Gene (blaTEM-1, blaSHV-28 sowie blaCTX-M-2) nachgewiesen. Die häufigsten ESBL waren insgesamt die Typen CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-9 und CTX-M-15. Es gab zwei Isolate, die eine neue CTX-M-Variante (CTX-M-58) enthielten, die Ceftazidim-Resistenz vermittelt.

Außerdem wurde bei 29 *E.-coli*-Isolaten eine Resistenz gegenüber Cefoxitin nachgewiesen. Bei zwei dieser Isolate war das auf eine erworbene AmpC-Beta-Laktamase (CMY- Enzyme) zurückzuführen. Bei den übrigen 27 Isolaten konnten Mutationen im Promoter des chromosomalen AmpC-Gens identifiziert werden, die zu einer AmpC-Überexpression und dadurch zur Cephalosporin-Resistenz führten. Durch verschiedene Basenpaarsubstitutionen im AmpC-Promoter kam es entweder zur Entstehung eines neuen Promoters, oder der ursprüngliche, schwache Promoter wurde effizienter. Bei neun der 27 Isolate konnten mithilfe der Makrorestriktionsanalyse (PFGE) sehr ähnliche Bandenmuster gezeigt werden. Da diese Isolate (unterschiedlicher regionaler Herkunft) eine identische Promoter-Struktur besaßen, wurde auf eine klonale Verbreitung geschlossen. Allerdings zeigten elf weitere Isolate mit den gleichen Promoter-Mutationen sehr verschiedene Makrorestriktionsmuster, sodass auf eine konvergente Evolution dieser Mutanten postuliert wurde.

Die derzeitige ESBL-Verbreitung und -Resistenzsituation führt zu einem verstärkten Einsatz von Carbapenemen in der Humanmedizin, was wiederum eine Resistenzselektion und Ausbreitung Carbapenem-resistenter Erreger bewirken kann. Somit steigt zunehmend die Gefahr der Entstehung nicht behandelbarer Infektionserreger und -krankheiten (RKI, 2007).

1.2.7 Verbreitung ESBL-/AmpC- bildender Erreger bei Nutztieren

Unterschiedliche Studien wurden in den letzten 15 Jahren zum Vorkommen dieser Resistenzen in Nutztieren durchgeführt. Allerdings geht es bei den meisten Studien um die Verbreitung dieser Resistenzen bei *E. coli* (Hille et al., 2014). Von Hille et al. wurden ausgewählte Publikationen, die sich mit dem Auftreten ESBL- und AmpC-produzierender *E. coli* in Nutztierbeständen aus den Bereichen Geflügel, Schwein und Rind in Europa (Europäische Union und Schweiz) von 2003 bis 2013 befassen,

zusammenfassend dargestellt. Diese Publikationen sind durch ihre diverse Methodik nicht direkt vergleichbar, trotzdem konnte insgesamt eine sehr hohe Prävalenz ESBL- und AmpC-produzierender *E. coli* in Nutztierbeständen in Europa festgestellt werden. Auf Betriebsebene wurde ein Betrieb als positiv klassifiziert, wenn in mindestens einer der auf dem Betrieb genommenen Proben ESBL-/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten.

Für Geflügel wurde im Vergleich zu Schweine- und Rinderbeständen die höchste Prävalenz ermittelt, mit einer Betriebsprävalenz von über 40 % [Schwankungen von 25 % (30 von 120) (Endimiani et al., 2012) bis 100 % (Blanc et al., 2006); (Smet et al., 2008); (Friese et al., 2013)] und einer Einzeltierprävalenz von ca. 30 % [Schwankungen von 16 % (9 von 69) (SWEDRES-SVARM, 2013) bis 55 % (18 von 33) (Wasył et al., 2012)].

Für Schweine schwankten auf Betriebsebene die Ergebnisse für die Prävalenz sehr stark. So wurden Betriebsprävalenzen von ca. 11 % [Schwankungen von 1 % (1 von 137) (Wu et al., 2008) bis 80 % (8 von 10) (Blanc et al., 2006)] und Einzeltierprävalenzen von ca. 23 % [von 15 % (9 von 59) (Geser et al., 2012) bis 100 % (7 von 7) (Horton et al., 2011)] festgestellt. In der aus Dänemark stammenden bisher größten europäischen Studie zu ESBL bei Schweinen wurden die Tiere im Schlachthof beprobt. Die untersuchten Schweine stammten aus 679 Betrieben. Bei Tieren aus insgesamt 72 Betrieben (11 %) wurden ESBL-/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen (Agero et al., 2012).

Bei Rindern wurde gezeigt, dass die Art des Betriebes und die jeweilige Lebensphase der Tiere eine wichtige Rolle spielt. So wurden die höchsten Prävalenzen bei Kälbern beobachtet, während sie bei älteren Mastrindern deutlich niedriger waren. Nach der Kalbung wurden bei Milchkühen mehr positive Proben ermittelt als davor. Betriebsprävalenz von ca. 15 % [von 4 % (zwei von 51) (Endimiani et al., 2012) bis 87 % (39 von 45) (Schmid et al., 2013)] und die Einzeltierprävalenz von ca. 4 % [von 0 % (0 von 24) (Wasył et al., 2012) bis 100 % (3 von 3) (Horton et al., 2011)].

Die ermittelten Risikofaktoren für das Auftreten ESBL-/pAmpC-produzierender *E. coli* sind je nach Tierart unterschiedlich. In der Broilerproduktion konnten bisher kaum statistisch signifikante Risikofaktoren für das Auftreten ESBL-produzierender *E. coli* nachgewiesen werden. Das wird mit dem europaweit relativ ähnlichen Management der

Bestände und der kurzen Mastzeit begründet. Sowohl eine vertikale Übertragung von Großeltern- auf Elterntierherden und Masttiere als auch eine Zirkulation der Bakterien im Stall scheinen eine Rolle zu spielen (Borjesson et al., 2013; Carmo et al., 2014; Dierikx et al., 2013). Im Gegensatz dazu konnte in einigen Studien bei Schweinen der Einsatz von Antibiotika als Risikofaktor für das Auftreten ESBL-/AmpC-produzierender *E. coli* festgestellt werden (Jørgensen et al., 2007; Mollenkopf et al., 2013). Außerdem ist auch eine vertikale Übertragung von der Sau auf die Ferkel zu bedenken (Hansen et al., 2013). Bei Rindern wurden als Risikofaktoren neben dem Alter der Tiere und dem Einsatz von Antibiotika (Hartmann et al., 2012; Schmid et al., 2013) auch der häufige Zukauf von Tieren ermittelt (Reist et al., 2013; Snow et al., 2012). Rinder werden oft in Weidehaltung gehalten, daher ist hier die Gefahr einer Kontamination der Umwelt höher. Gleichzeitig nimmt das Risiko der Übertragung resistenter Bakterien aus Reservoirs in der Umwelt auf die Tiere, z. B. durch Weide, Fliegen, Wasser oder Wildtiere, zu (Guenther et al., 2011; Usui et al., 2013; Zurfluh et al., 2013).

1.3 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Epidemiologie und Diagnostik ESBL-tragender *Enterobacteriaceae* am IMMIP. Ziel der Arbeit war es, neue Methoden und Algorithmen für den Nachweis von ESBL zu etablieren. Darüber hinaus sollte mithilfe der molekularen Methoden die lokale Epidemiologie der ESBL-Genotypen und der dazugehörigen Stämme bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Tab. 3: Zur Erstellung der Arbeit verwendete Geräte (Bezeichnung, Modell, Hersteller).

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Automatisiertes Analysesystem	Phoenix™ 100	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Automatisiertes Analysesystem	VITEK® 2	bioMérieux SA (Nürtingen, Deutschland)
MALDI-TOF	VITEK® MS	bioMérieux SA (Nürtingen, Deutschland)
Nanodrop	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer mit Software V. 3.7.0	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
PCR-Cycler	Labcycler	Sensoquest (Göttingen, Deutschland)
Reagenzglasschüttler	Vortex Mixer	VWR International GmbH (Radnor, Pennsylvania, USA)
Schüttelwasserbad	SW22	JULABO GmbH (Seelbach, Deutschland)
Taumelschüttler	WT12	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Vortexer/Schütter	Vortex-Genie 2 (Model G560E)	Scientific Industries, Inc., (Bohemia, New Jersey, USA)
Zentrifuge	Heraeus Biofuge fresco	DJB Labcare Ltd (Newport Pagnell, Buckinghamshire, England)

2.2 Reagenzien und Materialien

Tab. 4: Zur Erstellung der Arbeit im Labor verwendete Reagenzien und Materialien [Hersteller (Standort, Land)].

Bezeichnung der Reagenzien	Hersteller (Standort, Land)
AmpC & ES β L Detection Discs	MAST Diagnostica GmbH (Reinfeld, Deutschland)
Cefpodoxim ES β L ID Disc Set	MAST Diagnostica GmbH (Reinfeld, Deutschland)
chromID [®] ESBL	bioMérieux SA (Nürtingen, Deutschland)
Columbia Agar with 5 % Sheep Blood	BD (Heidelberg, Deutschland)
Eppendorf Research plus (0.1– 2.5 μ l; 2 – 20 μ l; 20 – 200 μ l; 100 – 1000 μ l)	EPPENDORF AG (Hamburg, Deutschland)
ETEST [®] ESBL	bioMérieux SA (Nürtingen, Deutschland)
LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar (BD 214030)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Müller-Hinton-Agar II	BD (Heidelberg, Deutschland)
Reverser Hybridisierungskit	GenID [®] GmbH (Straßberg, Deutschland)
Safe-Lock 1,5 ml EPPENDORF TUBES [®]	EPPENDORF AG (Hamburg, Deutschland)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
TipONE [®] Pipettenspitzen	Starlab GmbH, (Hamburg, Deutschland)
UltraClean [®] Microbial DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, Inc. (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Ultrapure [™] Agarose	Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
β LACTA [™] Test	Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, Frankreich)
VITEK [®] 2 AST-N214	bioMérieux SA (Nürtingen, Deutschland)
Phoenix [™] UNMIC/ID-87	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

2.3 Klinische Isolate

Insgesamt wurden in dieser Studie 245 *Enterobacteriaceae*-Isolate untersucht. 173 Isolate stammen von Patientenproben aus der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) des Universitätsklinikums Bonn. Die Isolate wurden im Zeitraum von Juli 2012 bis Juni 2014 gesammelt. Vorwiegend handelt es sich um Isolate aus Patientenurin, Wundabstrichen, Bronchialsekreten und Blutkulturen. Die Auswahl der klinischen ESBL-Isolate erfolgte auf der Basis eines Vorscreenings in VITEK® 2 und/oder Wachstum auf ESBL-Screening-Agar (chromID® ESBL bioMérieux SA, Nürtingen, Deutschland). Ein repräsentatives Kollektiv an ESBL-negativen Isolaten wurde durch Einschluss aller *Enterobacteriaceae* aus den Urinproben über einen Zeitraum von zwei Wochen gesammelt. Replikate aus dem gleichen Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. Informationen zu den Patienten und deren Klinik wurden nicht erfasst. 72 *E.-coli*-Isolate stammten aus Fäkalabstrichen von Schweinen aus 35 deutschen und niederländischen Betrieben und Schlachthöfen, die im Rahmen eines MRSA- und ESBL- Überwachungsprogramms von Juni bis September 2012 gesammelt wurden (Schmithausen et al., 2015).

Die Isolate gehörten den Spezies *Escherichia coli* (n=170), *Klebsiella pneumoniae* (n=40), *Klebsiella oxytoca* (n=18), *Enterobacter cloacae* (n=4), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *Serratia marcescens* (n=3), *Proteus mirabilis* (n=3), *Morganella morganii* (n=1), *Citrobacter freundii* (n=1), *Pantoea agglomerans* (n=1), *Kluyvera cryocrescens* (n=1) und *Citrobacter amalonaticus* (n=1) an. Alle Schweine-Isolate (also alle Isolate, die aus Schweinen stammen) gehörten der Spezies *E. coli* an (Tab. 5) (Abb. 3).

Tab. 5: Spezies der untersuchten Isolate.

Spezies	Anzahl der Stämme
<i>Escherichia coli</i>	170
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
<i>Klebsiella oxytoca</i>	18
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
Summe:	245

■ *E. coli* ■ *Klebsiella spp.* □ andere Spezies

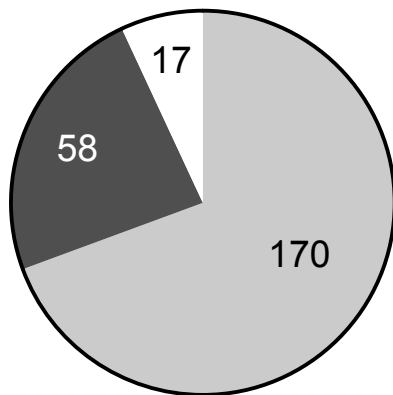


Abb. 3: Spezies der untersuchten Isolate.

2.4 Phänotypische Methoden

2.4.1 Speziesidentifizierung

2.4.1.1 VITEK® MS

VITEK® MS ist ein automatisiertes System für die Identifizierung von Mikroorganismen. Die Identifizierung der Mikroorganismen erfolgt mithilfe der Spektren, welche durch die MALDI-TOF-Technologie (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) ermittelt werden, und deren nachfolgenden Abgleichs mit der VITEK® MS-Datenbank mit den Spektren klinisch relevanter Mikroorganismen.

Mit der **MALDI-TOF**-Technologie (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight), die von VITEK® MS verwendet wird, werden die Muster von kleinen, v.a. ribosomalen, Proteinen untersucht, die direkt aus der bakteriellen Schmierpräparation gemessen werden. Die zu untersuchende Probe wird auf einem Target mit einer weiteren Komponente, der sogenannten Matrix, gemischt und dann mit einem Laser bestrahlt. Die Matrix absorbiert das Laserlicht, verdampft zusammen mit der Probe und erhält bei diesem Vorgang eine elektronische Ladung (Ionisierung). Elektrische Felder leiten dann die Ionen in das Flugzeit-Massenspektrometer, welches die Ionen gemäß ihrer Masse-/Ladungs-Verhältnisse auftrennt und danach die Menge jedes Ions misst. Die Ergebnisse stehen mit diesem Verfahren innerhalb von Minuten zur Verfügung.

2.4.2 Resistenzbestimmung

2.4.2.1 Automatisierte Antibiotika-Empfindlichkeitstestung

Die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung der Isolate wurde mithilfe der automatisierten Analysesysteme VITEK® 2 (mit dem Panel AST-N214) und Phoenix™ 100 (mit dem Panel UNMIC/ID-87) und deren ESBL-Screening-Algorithmen untersucht. Für die Interpretation der von den Automaten gemessenen minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurden nach EUCAST klinische MHK-Grenzwerte verwendet.

2.4.2.2 chromID® ESBL-Selektivagar

Als Screeningmedium für Resistenz gegen ESBL bzw. Cephalosporine der dritten Generation stand für die Schweineproben und bei humanen Screeningabstrichen chromogener, mit Cefpodoxim angereichertes chromID® ESBL (bioMérieux SA, Nürtingen, Deutschland) zur Verfügung. Die Auswertung des Tests erfolgte nach Inkubation bei 35°C über 18-24 Stunden. Beim Vorliegen von ESBL kommt es zum Wachstum. Alle Isolate wurden zwecks Kontrolle auf diesem Agar bebrütet. chromID® ESBL bietet auch eine direkte Identifizierung der häufigsten *Enterobacteriaceae* über eine Färbung:

Tab. 6: Identifizierung der häufigsten *Enterobacteriaceae* mittels chromID® ESBL

Spezies	Färbung
<i>Escherichia coli</i>	rosa bis dunkelrot
<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> (KESC)	grün/blau bis braun-grün
Proteeae (<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Morganella</i>)	dunkel- bis hellbraun

2.5 Genotypisierung der ESBL

In dieser Arbeit wurde bakterielle DNA mithilfe von UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, California, USA) gewonnen. Die Zielgene (ESBL-Gene) wurden zunächst mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert.

2.5.1 DNA-Isolierung

Die Bakterien werden in dieser Lösung suspendiert, indem mehrere einzeln liegende Kolonien einer 18-24 Stunden alten Reinkultur auf Columbia-Blutagar (ohne Zusatz) mithilfe eines sterilen Wattestäbchens in das 2 ml Collection Tube verbracht und dann

gemischt wurden. Dann wurden sie bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 300 µl MicroBead Solution resuspendiert und sanft vibriert zum Durchmischen. Dann wurden die resuspendierten Zellen in MicroBead Tube übertragen und 50 µl gemischte Solution MD1 wurden zugegeben.

MicroBead Tubes wurden mithilfe von MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex durchmischt; durchmischt wurde bei maximaler Geschwindigkeit für zehn Minuten. Man sollte sicherstellen, dass MicroBead Tubes in der Zentrifuge ohne Reibung frei rotieren. Dann wurde bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Collection Tube übertragen; man soll mit ca. 300-350 µl Überstand rechnen. Dann wurden 100 µl Solution MD2 zugegeben, fünf Sekunden durchmischt und bei 4°C für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde es bei 10.000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Collection Tube übertragen; man soll mit ca. 450 µl Überstand rechnen und das Pellet vermeiden. 900 µl gemischte Solution MD3 wurden zugegeben und für fünf Sekunden durchmischt. 700 µl des Gemisches wurden in Spin Filter übertragen und dies wurde dann bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und den restlichen Überstand in Spin Filter zugegeben und wieder bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

300 µl Solution MD4 wurden zugegeben und bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend bei 10.000 x g für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei man darauf achten muss, dass man keine Flüssigkeit auf dem Spin Filter-Korb spritzt. Der Spin Filter wurde in ein neues Collection Tube platziert. 50 µl Solution MD5 wurden ins Zentrum der weißen Filtermembran zugegeben. Dann wurde bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Spin Filter verworfen.

Die isolierte DNA im Tube wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der automatisierten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Das Prinzip wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Hierfür erhielt er 1993 den Nobelpreis für Chemie. Die Vermehrung einer DNA-Matrize erfolgt zyklisch, indem

zunächst die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA bei 94°C denaturiert wird. Daraufhin können bei niedrigeren Temperaturen (zwischen 50-60°C) zwei kurze (20-25 Basen) Oligonukleotidprimer mit der Matrize hybridisieren. Anschließend erfolgt bei ca. 72°C die Elongation der Primer vom 3'OH-Ende her mithilfe einer hitzestabilen Polymerase und freier Desoxynukleotide. Dies führt zur Komplementierung der Matrize in doppelsträngige DNA, welche der Ausgangsmatrize exakt gleicht. Bei jedem Durchlauf eines Zyklus verdoppelt sich somit das gewünschte Fragment. In einem so genannten Cycler findet eine automatisierte Wiederholung dieses Vorgangs statt, sodass die Anzahl der amplifizierten DNA exponentiell ansteigt.

Um Pipettierschritte einzusparen und ungenaues Pipettieren als Fehlerquelle auszuschließen wurde ein Mastermix aus PN-Mix, Puffer, MgCl₂-Lösung, DNA-Polymerase und gegebenenfalls Wasser hergestellt. Dieser Mastermix wurde dann in PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und anschließend wurde DNA zugegeben.

Das sollte in einem Raum erfolgen, der getrennt vom Thermocycler und damit frei von amplifizierter DNA ist. Es sollten DNase-freie Reaktionsgefäße und sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz verwendet werden. Die DNA-Konzentration sollte zwischen 150 und 300 ng liegen und wurde photometrisch mithilfe des Nanodrops gemessen. Die PCR-Ansätze enthielten: (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Versuchsansätze der PCR. Aufgelistet sind die benutzten Reagenzien mit entsprechenden Mengen.

Reagenz	Volumen
PN-Mix ESBL	16,5 µl
Polymerase Puffer	2,75 µl
MgCl ₂ -Lösung (Endkonzentration 1,5 mM)	1,65 µl
DNA-Polymerase	0,22 µl
H ₂ O	3,718 µl
Proben-DNA (ca. 150-300ng)	5 µl
Endvolumen	25 µl

Programmierungsprotokoll für den Thermocycler: (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Temperatur und Zeiten der PCR. Angegeben sind die Temperaturen und Zeiten der PCR in Abhängigkeit von der Zyklusphase.

Zyklusphase	Zeit	Temperatur (°C)	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
Denaturierung	30 min	95°C	10
	2 min	60°C	
Anlagerung	10 s	95°C	20
	30 s	55°C	
Elongation	30 s	72°C	1
	8 min	72°C	
	∞	8°C	

2.5.3 Reverse Hybridisierung

Identifiziert und differenziert wurden die mit der PCR amplifizierten Genfragmente mittels reverser Hybridisierung (GenID[®] GmbH, Straßberg, Deutschland) durch eine Hybridisierungsreaktion mit sequenzspezifischen Oligonukleotidsonden (SSOP), die auf Nitrocellulosestreifen immobilisiert sind (reverser Hybridisierungsblot). Der Kit der GenID GmbH ermöglichte als Schnelltest den DNA-Nachweis der Beta-Laktamase-Gene CTX-M und KPC und der wichtigsten Mutationen der Beta-Laktamase-Gene TEM und SHV.

Die auf den Streifen immobilisierten Gensonden sind homolog zu den Sequenzen der Beta-Laktamase-Gene; außerdem sind Positiv- und Negativkontrollen enthalten. In der Hybridisierungsreaktion binden die PCR-Produkte an die Gensonden. Durch hochspezifische Waschschrte wird gewährleistet, dass diese Bindung nur erhalten bleibt, wenn jeweils die Sequenz der Sonde und PCR-Produkte miteinander zu 100 % komplementär sind. An die Hybride aus Gensonde und biotinyliertem Amplifikat bindet Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase. Dann wird dieser Komplex durch eine Farbumsetzung des NBT/BCIP an der alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Das entstandene Bandenmuster wurde mithilfe eines im Kit mitgelieferten Auswertebogens analysiert (Abb. 4).

Anhand dieser Auswertung können folgende Beta-Laktamase-Gene nachgewiesen werden:

16S Pan Bacteria (Kontrolle), TEM AS 104 E (Wildtyp), TEM AS 104 K (ESBL), TEM AS 164 R (Wildtyp), TEM AS 164 S (ESBL), TEM AS 164 H (ESBL), TEM AS 238 G (Wildtyp), TEM AS 238 S (ESBL), SHV AS 179 D (Wildtyp), SHV AS 179 A (ESBL), SHV AS 179 G (ESBL), SHV AS 179 N (ESBL), SHV AS 238/240 (Wildtyp), SHV AS 238/240 (ESBL), CTX-M, *K. Pneumoniae* Karbapenemase (KPCs).

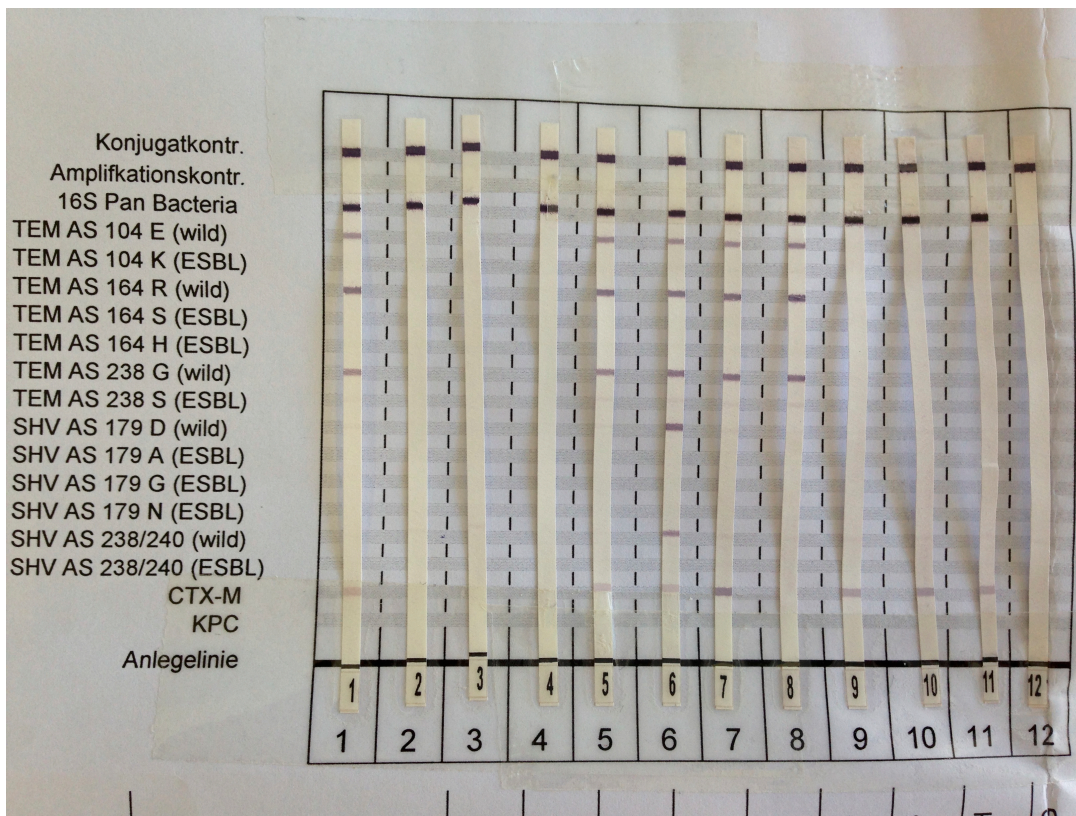


Abb. 4: Auswertebogen des GenID reversen Hybridisierungskits mit Kontroll- und Markerzonen auf dem Nitrocellulosestreifen.

Hybridisierungspuffer und Stringent-Waschlösung wurden auf 47°C vorgewärmt, alle anderen Lösungen auf Raumtemperatur angewärmt. Das Konjugat-Konzentrat wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:100 mit Konjugat-Puffer verdünnt. Das Rinse-Konzentrat wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

In den markierten Kavitäten wurden 20 µl Denaturierungsreagenz pipettiert. Dann wurden 20 µl Amplifikat des PCR-Ansatzes zu dem Tropfen Denaturierungsreagenz pipettiert, gut gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

1 ml auf 47°C vorgewärmter und gemischter Hybridisierungspuffer wurde zugegeben. Anschließend wurden die Streifen mit einer Pinzette in die markierten Kavitäten gelegt (Wichtig ist es, dass die Streifen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein müssen und die beschichtete Seite, erkennbar durch die aufgedruckte Zahl, nach oben weist).

Als nächstes wurde für 30 Minuten bei 47°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde Hybridisierungspuffer vollständig von den einzelnen Kavitäten abgossen und die Streifen zweimal eine Minute mit je 1 ml auf 47°C vorgewärmter und gemischter Stringent-Waschlösung bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler gewaschen.

Dann wurde wieder 1 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung in den Kavitäten pipettiert und 15 Minuten bei 47°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Ab diesem Schritt wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

Die Lösung wurde abgegossen und dann Streifen zweimal mit je 1 ml verdünnter Rinse-Lösung je eine Minute unter Schütteln gewaschen. Dann wurde die Lösung abgeklopft und 1 ml vorbereitetes Konjugat zu jedem Streifen gegeben und 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler inkubiert.

Konjugat wurde dann entfernt und dreimal je eine Minuten mit je 1 ml verdünnter Rinse-Lösung unter Schütteln gewaschen.

1 ml auf Raumtemperatur erwärmtes Substrat wurde zugegeben und je nachdem wie schnell die Farbreaktion ablief, etwa zehn bis 20 Minuten auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser beendet. Anschließend wurden die Streifen mit der Pinzette aus den Kavitäten genommen und zum Trocknen auf Filterpapier gelegt. Die Bandenmuster des getrockneten Streifens wurden mithilfe eines mitgelieferten Auswertebogens analysiert. Die Streifen sollten lichtgeschützt aufbewahrt werden.

2.6 Phänotypische Bestätigungstests

Da der Kit der GenID GmbH nur zur Detektion der wichtigsten ESBL-Genotypen dient, ist es nicht auszuschließen, dass die dabei als negativ analysierten Stämme ESBL-Genotypen bilden, die nicht mit dem reversen Hybridisierungskit nachgewiesen werden können.

Aus diesem Grund wurden die Isolate, die bei der Genotypisierung negativ herauskamen, mit folgendem Plattendiffusionstest und E-Test untersucht:

2.6.1 Cefpodoxim ESBL ID Disc Set (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland)

Dabei handelt es sich um einen Plattendiffusionstest. Die Hemmhofdurchmesser um Cephalosporin-Blättchen (in diesem Fall Cefpodoxim) werden mit den Hemmhofdurchmessern um Blättchen, die dasselbe Cephalosporin und Clavulansäure enthalten, verglichen (Abb. 5). Beim Anstieg des Hemmhofdurchmessers von ≥ 5 mm um das Testblättchen mit Clavulansäure, gilt die ESBL-Bildung als nachgewiesen. Es ist kostengünstig. Die Durchführung und Interpretation sind einfach.

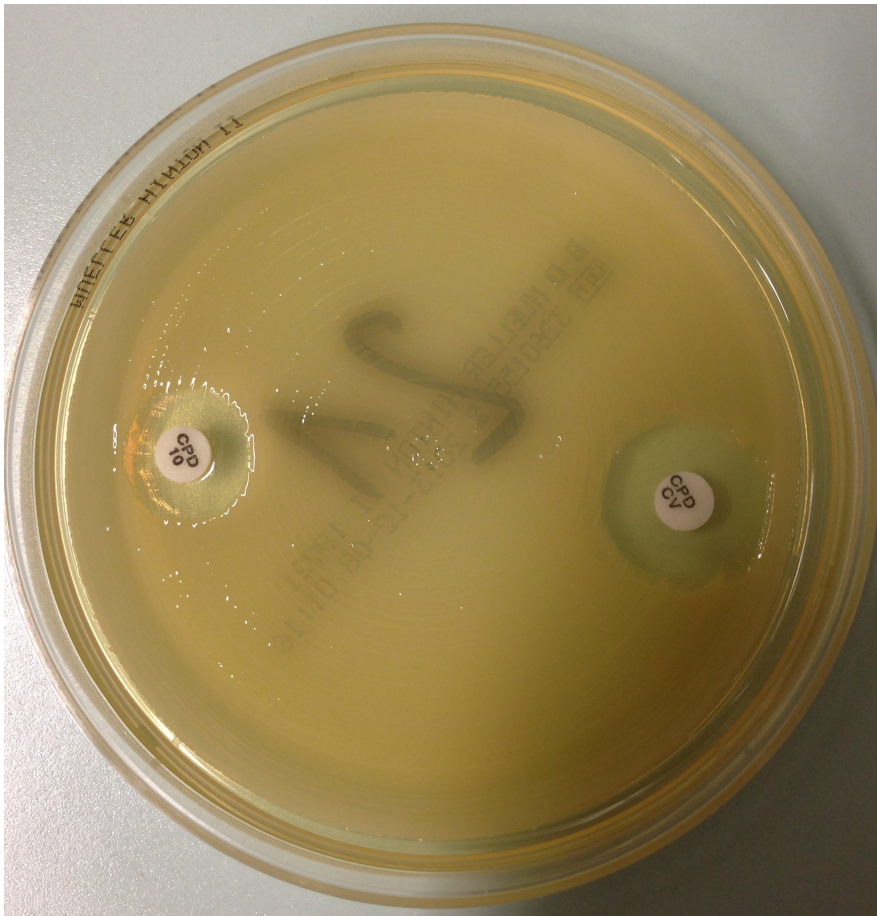


Abb. 5: Cefpodoxim ESBL ID Disc Set. Die ESBL-Bildung ist nicht nachweisbar.

2.6.2 AmpC & ESBL Detection Discs (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland)

Dabei handelt es sich auch um einen Plattendiffusionstest. Die Hemmhofdurchmesser um vier Blättchen werden miteinander verglichen:

A: Cefpodoxim

B: Cefpodoxim + ESBL-Inhibitor

C: Cefpodoxim + AmpC-Inhibitor

D: Cefpodoxim + ESBL-Inhibitor + AmpC-Inhibitor

Die Interpretation erfolgte nach den Herstelleranweisungen.

Das war die einzige Methode in dieser Arbeit, mit der AmpC-Aktivität beurteilt wurde (Abb. 6).



Abb. 6: AmpC & ESBL Detection Discs. Der ESBL-Nachweis ist negativ und der AmpC-Nachweis ist positiv.

2.6.3 ETEST® ESBL Ceftazidim (TZ) / Ceftazidim+Clavulansäure (TZL) (bioMérieux SA, Nürtingen, Deutschland)

Es handelt sich um einen vorgefertigten, stabilen Antibiotikagradienten auf einem Kunststoffträgermaterial. Durch die innovative Trockenchemie-Technologie ermöglicht E-Test anhand der Skalierung die direkte Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Antibiotika. Die Kunststoffstreifen sind von der Mitte bis zu beiden Enden mit ansteigender Cephalosporin-Konzentration versehen und die eine Hälfte enthält zusätzlich Clavulansäure in konstanter Konzentration. Die ESBL-E-Tests sind mit Cefotaxim, Ceftazidim und Cefepim erhältlich. Für diese Arbeit wurden E-Tests mit Ceftazidim verwendet. Der Streifen wird auf inokulierte Agar gelegt und wird dann bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ für 16-20 Stunden inkubiert. Dabei diffundiert das Antibiotikum in den Agar und bildet sich durch Hemmung des Bakterienwachstums eine symmetrische Hemmellipse gleichmäßig entlang des Streifens. Der MHK-Wert wird direkt von der

Skala in µg/ml an dem Punkt abgelesen, wo sich Hemmellipse und Streifen schneiden. Es können sogenannte Phantomzonen oder Deformation der Hemmellipse auf der Seite ohne Clavulansäure entstehen. Mit dem E-Test gilt die ESBL-Bildung als nachgewiesen, wenn der MHK-Wert mit Clavulansäure um Faktor acht größer ist als ohne Clavulansäure. Wenn die MHK-Werte eines Isolates über den MHK-Werten des E-Test-Streifens liegen, ist der E-Test nicht auswertbar. Einzelkolonien von Mutanten innerhalb der Hemmhöfe können die Interpretation erschweren (Abb. 7).



Abb. 7: E-Test-Streifen mit Ceftazidim (TZ) / Ceftazidim+Clavulansäure (TZL). Der ESBL-Nachweis ist negativ.

2.6.4 β LACTATM-Test (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, Frankreich)

Der β LACTATM-Test dient dem Schnelldiagnose von ESBL oder Carbapenemasen (KPC, MBL) und erworbener AmpC. Dieser Test beruht vom Prinzip her auf der Spaltung des chromogenen Substrats HMRZ-86 (chromogenes Cephalosporin). Dieses anfangs gelbe Substrat wird bei Vorhandensein von Beta-Laktamase-bildenden *Enterobacteriaceae*-Stämmen, die gegen Cephalosporine der dritten Generation resistent sind, rot. HMRZ-86 wird von erworbenen Penicillinasen (z. B.: SHV-1, TEM-1) nicht hydrolysiert, jedoch von ESBL oder Carbapenemasen (KPC, MBL) und von erworbener AmpC.

Das β LACTATM-Kit enthält zwei Tropfflaschen mit den zu mischenden Reagenzien (R1 und R2).

Als erstes wurde das Mikroröhrchen beschriftet, dann in das Mikroröhrchen ein Tropfen Reagenz R1 und ein Tropfen Reagenz R2 gegeben. Mehrere einzeln liegende Kolonien einer 18-24 Stunden alten Reinkultur auf Columbia-Blutagar (ohne Zusatz) wurden in das Mikroröhrchen mithilfe einer sterilen 1- μ l-Impföse verbracht, dann mit dem Reaktionsgemisch gemischt. Es wurde immer die Farbe des Gemisches zum Zeitpunkt T0 notiert, die Mikroröhrchen bei Raumtemperatur stehen gelassen und das Ergebnis innerhalb von 15 Minuten abgelesen (Abb. 8).

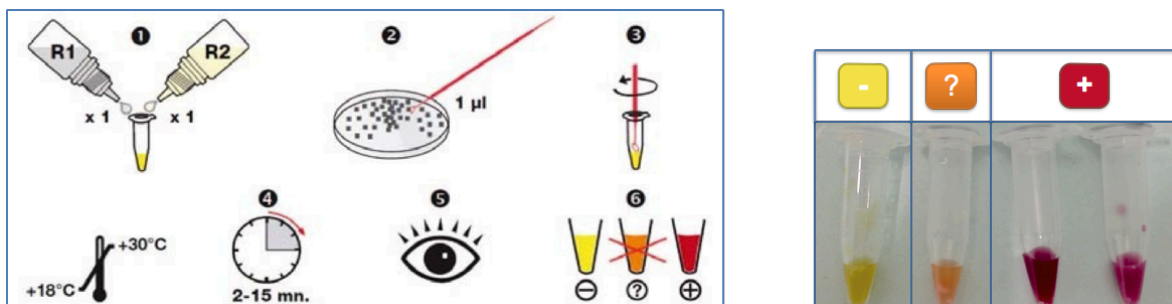


Abb. 8: Prozedur und Interpretation des β LACTATM-Tests.

Als Qualitätskontrolle ist Folgendes vom Hersteller vorgeschlagen:

- Negative Kontrolle, z.B.: *Escherichia coli* ATCC 35218 (Typ TEM-1 β -Laktamase bildender Stamm).
- Positive Kontrolle, z.B.: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 51446 (Diese Stämme enthalten Beta-Laktamasen, die Resistenz gegen Wirkstoffe der dritten Generation vermitteln). Für Routinetests kann ein gut charakterisierter klinischer Stamm mit ESBL-Phänotyp verwendet werden.

3. Ergebnisse

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt, wurden die Phänotypen (Spezies, Antibiotikasensibilität) der untersuchten *Enterobacteriaceae* anhand von chromID[®] ESB, VITEK[®] MS, VITEK[®] 2 und Phoenix[™] 100 bestimmt. Dann wurden deren ESB-Genotypen anhand des reversen Hybridisierungskits der Firma GenID bestimmt, und bei Unklarheiten mit Plattendiffusionstest und E-Test bestätigt, wobei dies auch bei allen PCR-negativen Isolaten erfolgte. Somit wurde der β LACTA[™]-Test validiert (Abb. 9).

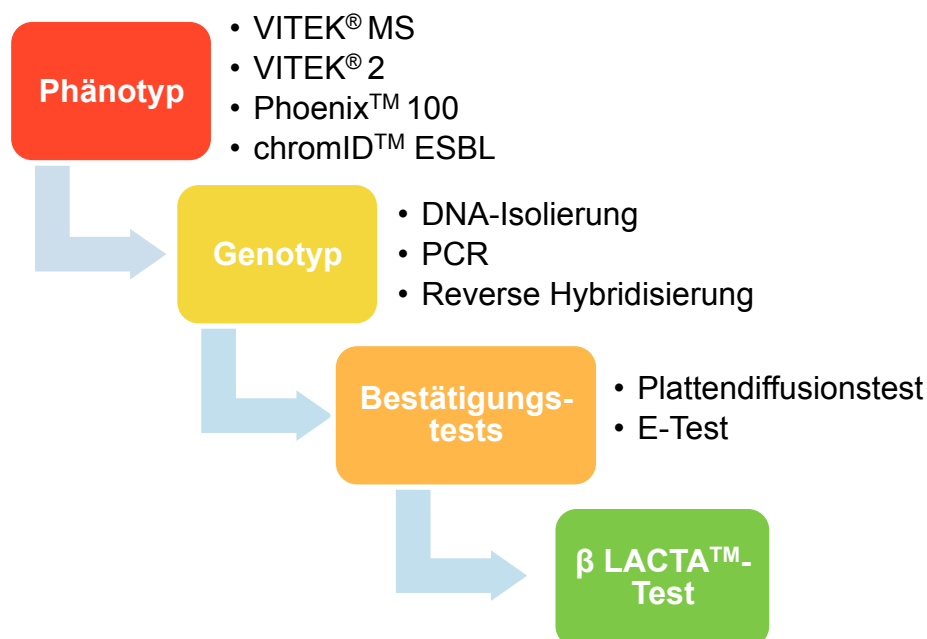


Abb. 9: Die Arbeitsschritte und -methoden. Dabei wurden die Phänotypen (Spezies, Antibiotikasensibilität) der untersuchten *Enterobacteriaceae* anhand von VITEK[®] MS, VITEK[®] 2, Phoenix[™]100 und chromID[®] ESB bestimmt. Dann wurden deren ESB-Genotypen anhand des reversen Hybridisierungskits der Firma GenID bestimmt, und bei Unklarheiten mit Plattendiffusionstest und E-Test bestätigt. Somit wurde der β LACTA[™]-Test validiert.

3.1 Genotypisierung der ESB-Stammkollektion

In der mikrobiologischen Diagnostik im IMMIP wurde zum Zeitpunkt der Arbeit nur eine phänotypische Identifizierung von ESB anhand der gemessenen MHK (VITEK[®]2-AST + VITEK[®]2-ESB-Test bzw. Wachstum auf ESB Selektivagar + VITEK[®]2-AST) durchgeführt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde der GenID reverse Hybridisierungskit zum Nachweis der ESB-Gene etabliert und validiert.

Bei 155 der 245 untersuchten Isolaten war der ESBL-Test sowohl in VITEK® 2 als auch in Phoenix™ 100 positiv. Diese sind auch auf dem ESBL-Agar gewachsen. Bei weiteren 46 Isolaten war der ESBL-Test in VITEK® 2 und Phoenix™ 100 übereinstimmend negativ. Bei den restlichen 44 Isolaten war der ESBL-Test in VITEK® 2 oder in Phoenix™ 100 negativ oder nicht auswertbar.

In den untersuchten Isolaten wurden ESBL-Gene in den Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *Kl. cryocrescens* und *P. agglomerans* nachgewiesen. Es konnten TEM-, SHV-, und CTX-M-ESBL identifiziert werden. In 151 Isolaten wurde ein Beta-Laktamase-(bla-)Gen nachgewiesen (bla_{CTX-M}, n = 148; bla_{SHV}, n = 3). Weitere fünf Isolate enthielten jeweils zwei bla-Gene (bla_{SHV} + bla_{CTX-M}, n = 3; bla_{TEM} + bla_{CTX-M}, n = 1, bla_{TEM} + bla_{TEM}, n = 1). Außerdem konnten in einem *K. pneumoniae*-Isolat bla_{KPC} und bla_{SHV} nachgewiesen werden.

Bei der Genotypisierung wurde festgestellt, dass von den 245 untersuchten Isolaten 157 (64,1 %) PCR-positiv und 88 (35,9 %) PCR-negativ sind. Die 88 PCR-negativen Isolate wurden mit Plattendiffusionstest und E-Test untersucht, um eine ESBL- und AmpC-Bildung auszuschließen. Bei diesen phänotypischen Bestätigungstests erwiesen sich 13 der 88 PCR-negativen Isolate als AmpC-Bildner, ein *K. oxytoca*-Isolat übereinstimmend in allen phänotypischen Bestätigungstests als ESBL-positiv und die übrigen 74 fast übereinstimmend als negativ (Abb. 10). Davon waren sieben Isolate im AmpC & ESBL Detection Discs Test nicht auswertbar und wurden nicht weiter untersucht.

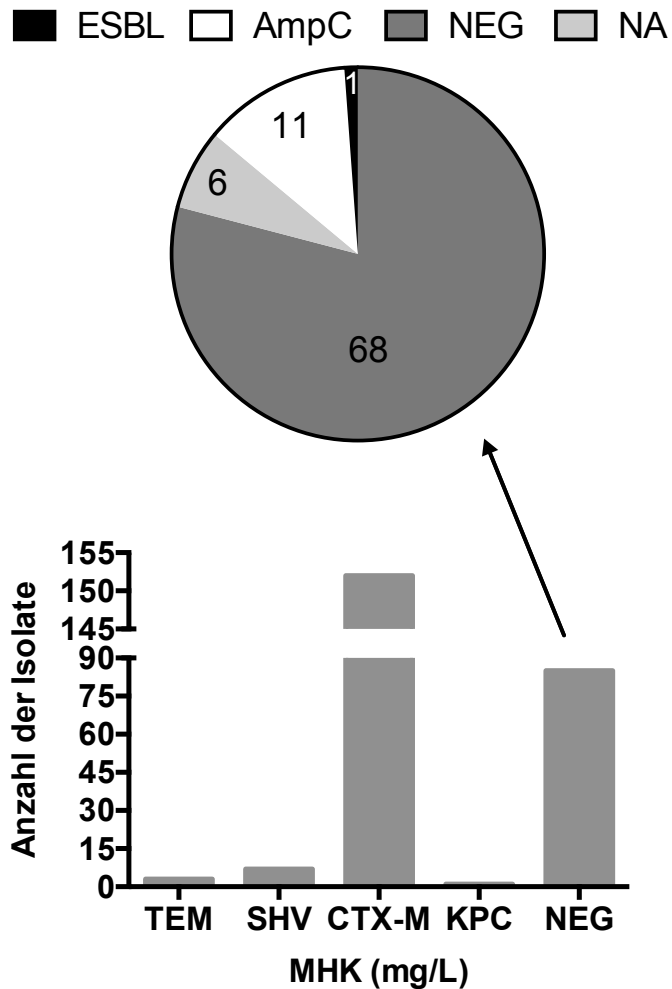


Abb. 10: Die Abbildung zeigt eine Übersicht der ESBL-Genotypen, die durch Gen-ID PCR nachgewiesen wurden. Die PCR-negativen Isolate sind beruhend auf phänotypischen Bestätigungstests weiter unterteilt in ESBL (schwarz), AmpC (weiß), NEG= negativ für beide (dunkelgrau) und NA= nicht auswertbar (hellgrau).

Mit dem kommerziell erhältlichen Hybridisierungskit konnte also der Genotyp nur bei einem einzigen Stamm nicht nachgewiesen werden, der aber in phänotypischen Bestätigungstests übereinstimmend ESBL-positiv getestet wurde. Darüber hinaus gab es einen genotypisch ESBL-positiven *K.-cryocrescens*-Stamm, der in allen phänotypischen Bestätigungstests negativ ausgewertet wurde. Folglich beträgt die mittels Tab. 9 ermittelte Sensitivität 99,4 % und die Spezifität 100 %.

Tab. 9: Sensitivität und Spezifität von GenID-PCR.

	GenID-PCR		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL+	157	1	158
ESBL-	0	87	87
Σ	157	88	245

In 139 der 155 Isolate, die zuvor durch VITEK[®] 2, Phoenix[™] 100 und chromID[®] ESBL als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert wurden, wurden auch ESBL-Gene nachgewiesen. Die restlichen 16 waren sowohl genotypisch als auch in den Bestätigungstests (E-Test und Plattendiffusionstest) negativ.

In zwei der 46 Isolaten, die zuvor in VITEK[®] 2 und Phoenix[™] 100 übereinstimmend als phänotypisch ESBL-negativ charakterisiert wurden, wurden ESBL-Gene nachgewiesen und in weiteren drei phänotypisch AmpC (anhand von AmpC & ESBL Detection Discs) nachgewiesen.

In den restlichen 44 Isolaten, bei denen zuvor in VITEK[®] 2 und Phoenix[™] 100 die ESBL-Bildung nicht übereinstimmend beurteilt wurde, wurden in 17 davon ESBL-Gene und in weiteren zehn Isolaten phänotypisch AmpC nachgewiesen. Damit wurde aus den phänotypischen und genotypischen Untersuchungen klar, dass von den 245 untersuchten Isolaten 158 (64,5 %) ESBL-positiv (davon ein Isolat auch KPC-positiv) waren. Die übrigen 87 (35,5 %) Stämme erwiesen sich als negativ und dienten als Negativkontrolle. Davon waren 14 Isolate AmpC-positiv (Abb.11).

■ ESBL ■ AmpC □ Negativkontrolle

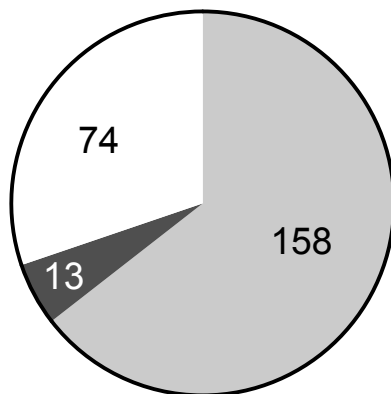


Abb. 11: Vorkommen von ESBL und AmpC in den untersuchten Isolaten als Endergebnis aller phänotypischen und genotypischen Untersuchungen.

3.2 Evaluierung des VITEK® 2-ESBL-Algorithmus

Mithilfe von VITEK® 2 wurden die Isolate auf ihre MHK und somit u.a. auf das Vorliegen einer phänotypischen 3GC-Resistenz getestet. Die Ergebnisse wurden gemäß den EUCAST-Richtlinien analysiert.

194 der 245 (79,2 %) untersuchten Isolate zeigten Resistenz gegenüber zumindest einer 3GC. Dabei waren 193 Isolate resistent gegenüber Cefpodoxim gemäß den EUCAST-Richtlinien (>1 mg/L), davon 173 (89,6 %) mit MHK ≥ 8 mg/L. 167 Isolate waren resistent gegenüber Cefotaxim gemäß den EUCAST-Richtlinien (>2 mg/L), davon 119 (71,3 %) mit MHK ≥ 64 mg/L. Auf der anderen Seite waren nur 80 der untersuchten Isolate (32,7 %) resistent gegenüber Ceftazidim gemäß den EUCAST-Richtlinien (>4 mg/L), davon nur 28 (35 %) ≥ 64 mg/L.

Alle 158 ESBL-Bildner bis auf einen phänotypisch und genotypisch ESBL-positiven Stamm zeigten im VITEK® 2-AST Resistenz gegenüber Cefotaxim und/oder Cefpodoxim. Dieses Isolat war allerdings intermediär gegenüber Ceftazidim.

157 (99,4 %) zeigten Cefpodoxim-Resistenz, davon 156 mit MHK ≥ 8 mg/L. 155 (98,1 %) zeigten Cefotaxim-Resistenz, 116 davon mit MHK ≥ 64 mg/L. Nur 76 (48,1 %) Isolate zeigten Ceftazidim-Resistenz, davon nur 25 mit MHK ≥ 64 mg/L.

Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 beschrieben, zeichnen sich ESBL durch ihre Hemmbarkeit durch β -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure oder Sulbactam aus. Jedoch zeigten nur 111 der 158 (70,25 %) ESBL-positiven Isolate Sensibilität gegenüber Piperacillin/Tazobactam gemäß den EUCAST-Richtlinien (<16 mg/L). Weitere acht

Isolate (5,1%) waren intermediär. Der größte Anteil ($25/39 = 64,1 \%$) der Piperacillin/Tazobactam-resistenten ESBL-positiven Isolate waren *Klebsiella spp.* Wiederum zeigten die meisten ($25/33 = 75,8 \%$) der ESBL-positiven *Klebsiella-spp.*-Isolate Piperacillin/Tazobactam-Resistenz.

In der ESBL-negativen Fraktion waren insgesamt 39/87 (44,8 %) 3GC-resistent.

38 Isolate waren resistent gegenüber Cefpodoxim. Ein AmpC-positives Isolat zeigte zusätzlich Resistenz gegenüber Ceftazidim und elf weitere Isolate (zehn davon AmpC-positiv) zeigten Resistenz gegenüber Cefotaxim. Wiederum waren von diesen elf Isolaten drei AmpC-positive Isolate zusätzlich Ceftazidim-resistent. Ein einziges Cefpodoxim-sensibles Isolat war Cefotaxim-resistent.

52 der 87 (59,8 %) ESBL-negativen Isolate zeigten Sensibilität gegenüber Piperacillin/Tazobactam. Weitere zwei Isolate (2,3 %) waren intermediär (Abb. 12).

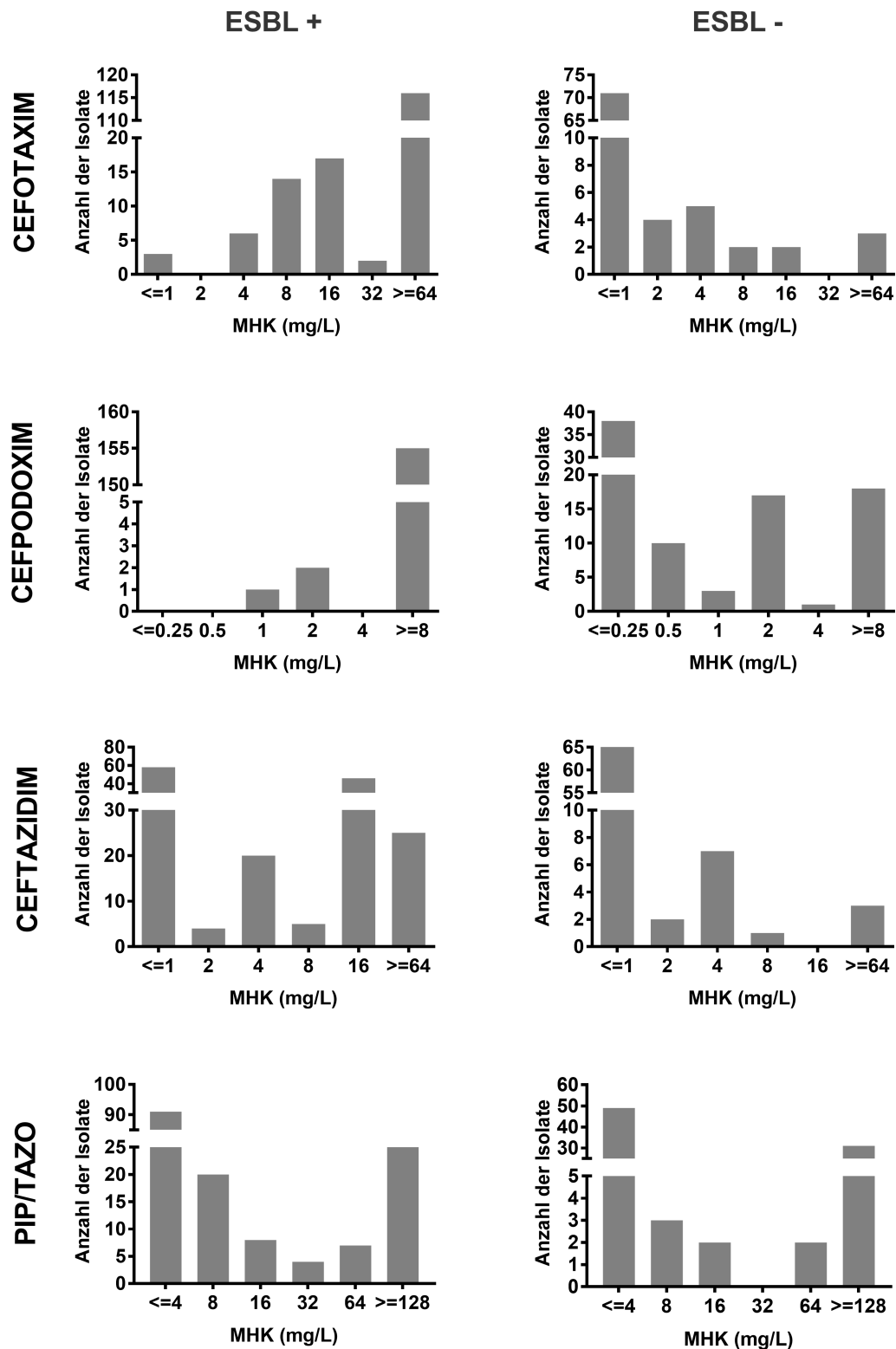


Abb. 12: Die mit VITEK® 2 ermittelten MHK-Werte (Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidim, Pip/Tazo) von ESBL-positiven (n=158) im Vergleich zu ESBL-negativen (n=87) Isolaten.

3.2.1 Bewertung des VITEK® 2-ESBL-Bestätigungstests

Im VITEK® 2-System erwiesen sich 173 Isolate als positiv, 48 als negativ und 24 waren nicht auswertbar (Abb. 13).

■ Positiv ■ Negativ □ Nicht auswertbar

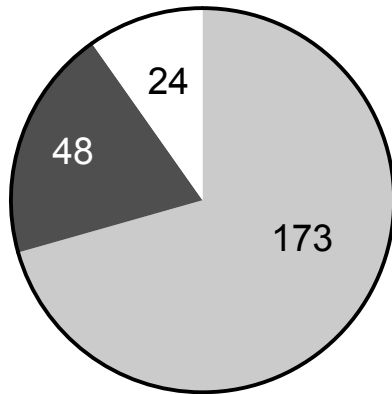


Abb. 13: Ergebnis des VITEK® 2-ESBL-Tests.

Von den 158 Isolaten, bei denen in unseren Untersuchungen die ESBL-Bildung nachgewiesen wurde, waren im VITEK® 2-ESBL-Test 148 positiv, zwei negativ und acht nicht auswertbar.

Von den 87 ESBL-negativen Isolaten waren im VITEK® 2-ESBL-Test 46 negativ, 25 positiv und 16 nicht auswertbar.

Somit wurde für den ESBL-Bestätigungstest des VITEK® 2-Systems eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 64,8 % ermittelt (Tab. 10).

Tab. 10: Sensitivität und Spezifität des VITEK® 2-ESBL-Tests.

Acht ESBL-positive Isolate und 16 ESBL-negative Isolate waren nicht auswertbar.

	VITEK® 2-ESBL-Test		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL +	148	2	150
ESBL -	25	46	71
Σ	173	48	221

3.3 Bewertung des PhoenixTM100-ESBL-Bestätigungstests

Im ESBL-Bestätigungstest des PhoenixTM100-Systems erwiesen sich 165 Isolate als positiv, 79 als negativ und eines war nicht auswertbar (Abb. 14).

■ Positiv ■ Negativ □ Nicht auswertbar

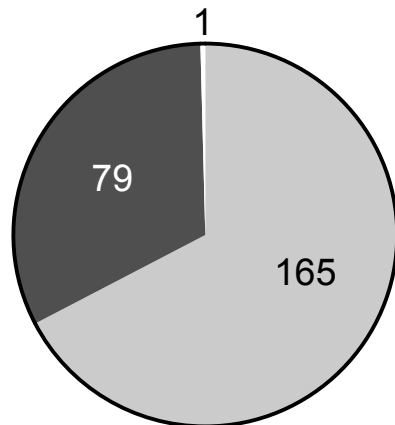


Abb. 14: Ergebnis des PHOENIXTM100-ESBL-Tests.

Von den 158 Isolaten, bei denen in unseren Untersuchungen die ESBL-Bildung nachgewiesen wurde, waren im PhoenixTM100-ESBL-Test 143 positiv, und 15 negativ.

Von den 87 ESBL-negativen Isolaten waren im PhoenixTM100-ESBL-Test 64 negativ, 22 positiv und eines nicht auswertbar.

Somit wurde für den ESBL-Bestätigungstest des PhoenixTM100-Systems eine Sensitivität von 90,5 % und eine Spezifität von 74,4 % ermittelt (Tab. 11).

Tab. 11: Sensitivität und Spezifität des PhoenixTM100-ESBL-Tests.
Ein ESBL-negatives Isolat war nicht auswertbar.

	Phoenix TM 100-ESBL-Test		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL +	143	15	158
ESBL -	22	64	86
Σ	165	79	244

3.4 Etablierung von chromID[®] ESBL

Beim ESBL-Screening mit chromID[®] ESBL wuchsen 236 Stämme auf der Platte; nur neun wuchsen nicht. Alle neun nicht gewachsenen Stämme gehören zur ESBL-negativen Fraktion (Abb. 15).

□ Positiv ■ Negativ

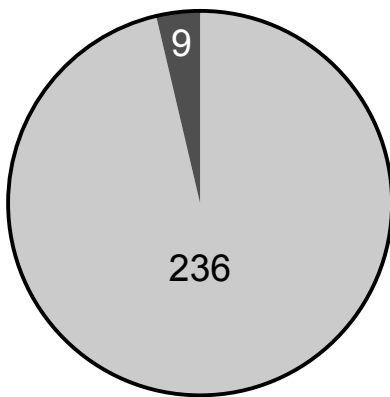


Abb. 15: Ergebnis von chromID[®] ESBL.

Somit wurde für chromID[®] ESBL eine Sensitivität von 100 % aber nur eine Spezifität von 8 % ermittelt (Tab. 12).

Tab. 12: Sensitivität und Spezifität von chromID[®] ESBL.

	chromID [®] ESBL		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL+	158	0	158
ESBL-	78	9	87
Σ	236	9	245

3.5 Evaluierung des β LACTA[™]-Tests als alternativer Schnelltest

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Validität des β LACTA[™]-Tests zu prüfen. Dieser Test dient laut Hersteller dem Schnelldachweis von 3GC-Resistenz, die auf ESBL oder Carbapenemasen (KPC, MBL) und erworbene AmpC zurückzuführen sind.

Unsere Ergebnisse des β LACTA[™]-Tests zeigten, dass 177 (72,2 %) Isolate β LACTA[™]-positiv, 65 (26,5 %) negativ und 3 (1,2 %) nicht auswertbar waren (Abb. 16).

■ Positiv ■ Negativ □ Nicht auswertbar

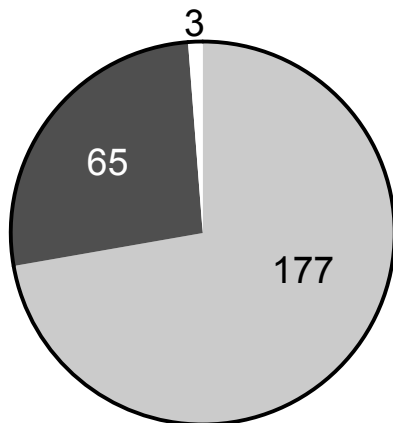


Abb. 16: Ergebnis des β LACTA™-Tests.

Von den 194 3GC-resistenten Isolaten waren 174 (89,7 %) β LACTA™-positiv, 17 negativ und drei nicht auswertbar.

Von den 171 Isolaten, die aus unseren Untersuchungen β -Laktamasen (ESBL, AmpC oder KPC) positiv waren, waren 160 (93,6 %) β LACTA™-positiv, 9 (5,3 %) β LACTA™-negativ und zwei (1,1 %) nicht auswertbar. Von den 74 phänotypisch und genotypisch als negativ charakterisierten Isolaten, waren 56 (75,7 %) β LACTA™-negativ, 17 (23 %) β LACTA™-positiv und eines (1,3 %) nicht auswertbar.

Somit wurde für den β LACTA™-Test nach Herstellerkriterium zur Detektion von ESBL oder Carbapenemasen (KPC, MBL) und erworbener AmpC eine Sensitivität von 94,7 % und eine Spezifität von 76,7 % ermittelt (Tab. 13).

Tab. 13: Sensitivität und Spezifität des β LACTA™-Tests nach Herstellerkriterium. 2.GC-R Isolate und ein 3.GC-S waren nicht auswertbar.

	β LACTA™		Σ
	Positiv	Negativ	
3.GC-R	160	9	169
3.GC-S	17	56	73
Σ	177	65	242

4. Diskussion

EUCAST und CLSI Richtlinien empfehlen, dass die erzielten Ergebnisse in den Empfindlichkeitsbestimmungen für Beta-Laktam-Antibiotika berichtet werden wie sie im mikrobiologischen Labor gemessen wurden. Doch die in-vitro-Sensibilität gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation kann nicht in allen Fällen die in-vivo-Wirksamkeit der Cephalosporine der dritten Generation bei Infektionen mit ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* vorhersagen. Dieses therapeutische Risiko führt zu intensiven Debatten und macht den Schnellnachweis von ESBL im Routinediagnostik-Labor notwendig. In dieser Studie wurde die Leistung eines neuen Tests, namens β LACTATM-Test, zum Schnellnachweis von ESBL beurteilt und seine potentiellen Anwendungsmöglichkeiten definiert.

Im Folgenden werden die aus den verschiedenen Methoden generierten Daten, die bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt wurden, sowohl miteinander als auch mit Daten anderer Studien verglichen.

Einige Bemerkungen zu den vorliegenden Ergebnissen müssen gemacht werden. Zunächst wurden die Isolate zwar auf Carbapenem-Empfindlichkeit nicht jedoch auf Carbapenemase-Bildung getestet. Auch wurden die PCR-Ergebnisse nicht durch Sequenzierung bestätigt.

4.1 Der β LACTATM-Test reflektiert Cefotaxim- und Cefpodoxim-Resistenz

Zur weiteren Bewertung des β LACTATM-Tests wurden die MHKs von ausgewählten Antibiotika für positive und negative β LACTATM-Ergebnisse miteinander verglichen.

174 der 194 (89,7 %) 3GC-resistenten Isolate waren β LACTATM-positiv, 17 -negativ und drei waren nicht auswertbar. 48 der 51 (94,1 %) 3GC-sensiblen Isolate waren β LACTATM-negativ und 3 -positiv. Beim Einsatz des β LACTATM-Tests zum Nachweis von 3GC-Resistenz ergibt sich eine Sensitivität von 91,1 % und eine Spezifität von 94,1 %.

Die Ergebnisse zeigten, dass die β LACTATM-positive Isolate hohe MHKs sowohl für Cefotaxim (66,7 % ≥ 64 mg/L und 89,8 % resistent gemäß EUCAST MHK-Grenzwerten) als auch für Cefpodoxim (92,7 % ≥ 8 mg/L) hatten. Während die negative Fraktion eine sehr variable Verteilung für Cefpodoxim-MHKs und niedrige MHKs für Cefotaxim (86,2 % ≤ 1 mg/L) zeigte. Weitere Analysen zeigten, dass es keine offensichtliche

Korrelation mit MHKs für Ceftazidim gab, beispielsweise wurden Isolate mit MHKs ≤ 4 mg/L in beiden Fraktionen gefunden. MHKs ≥ 8 mg/L war jedoch auf der positiven Fraktion beschränkt. In ähnlicher Weise beobachteten wir keine Korrelation mit Piperacillin/Tazobactam in beiden Fraktionen; MHK ≤ 1 mg/L und ≥ 128 mg/L wurden sowohl in der positiven als auch in der negativen Fraktion gefunden. Schlussendlich zeigten beide Fraktionen keine Unterschiede in den MHKs für Imipenem. Insgesamt zeigten die Ergebnisse des β LACTATM-Tests die klarste Unterscheidung zwischen Cefotaxim-sensiblen und -resistenten Isolaten. PhoenixTM100-AST lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Es ist somit ersichtlich, dass der Test keine zusätzlichen Informationen in Bezug auf die Vorhersage der in-vivo-Wirksamkeit von Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam beim Patienten liefert (Abb. 17).

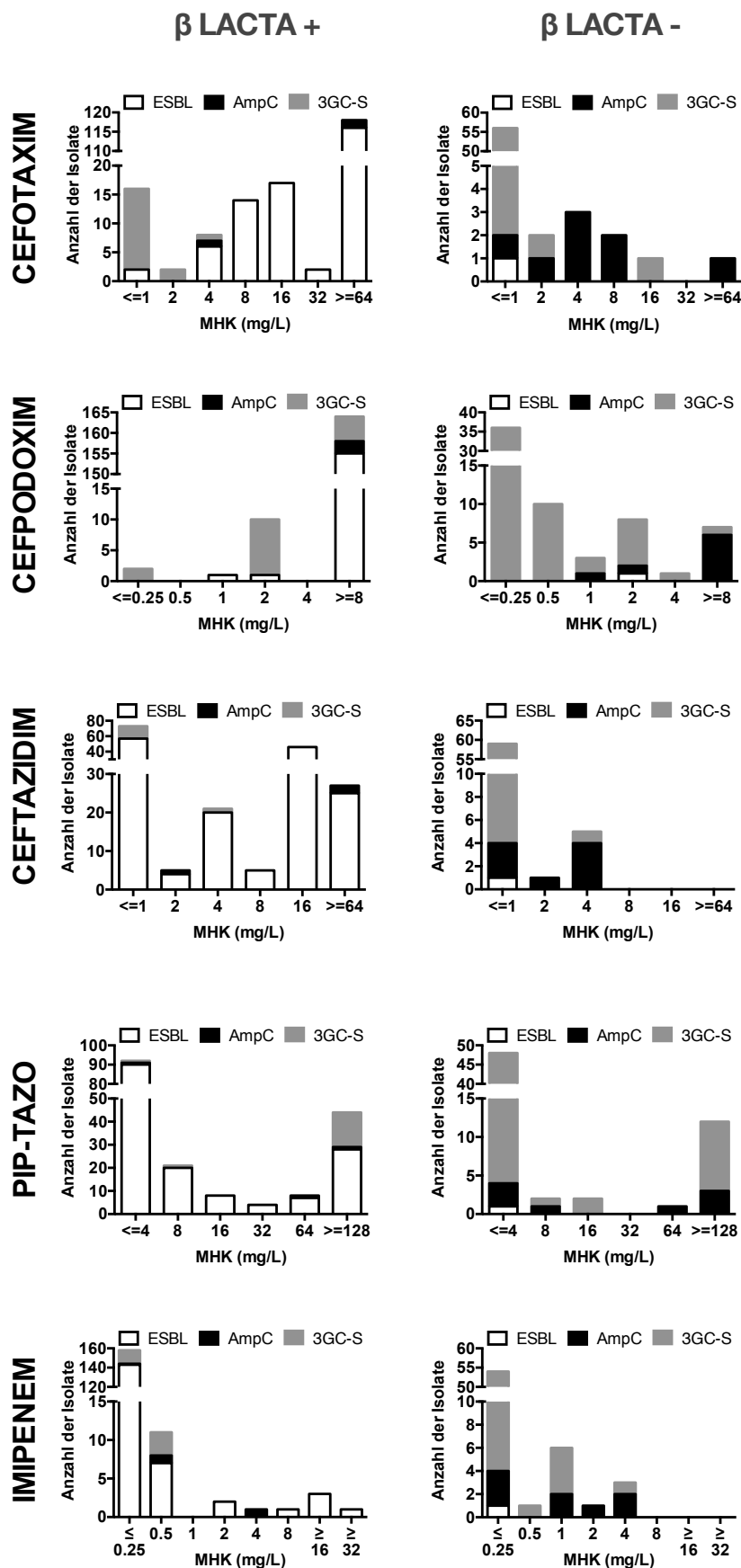


Abb. 17: MHK-Vergleich zwischen β LACTATM-positiven (n=177) und β LACTATM-negativen (n=65) Isolaten. Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen den Ergebnissen des β LACTATM-Tests mit den MHKs des VITEK[®]2-Systems für Cefotaxim und Cefpodoxim. 3GC= Cephalosporine der 3. Generation, S= sensibel.

4.2 Der β LACTATM-Test ist zuverlässiger zum Nachweis von ESBL

Wie bereits erwähnt, ergab sich bei der Verwendung des β LACTATM-Tests nach Herstellerkriterium zum Nachweis von ESBL oder Carbapenemasen (KPC, MBL) und erworbener AmpC eine Sensitivität von 94,7 % und eine Spezifität von 76,7 %.

Während alle ESBL-Bildner, bis auf einen PCR-positiven aber phänotypisch negativen *Kluyvera cryocrescens*, mit dem β LACTATM-Test zuverlässig nachgewiesen werden konnten, ist AmpC-Detektion mit dem β LACTATM-Test <30 % denn 8 von den 13 untersuchten AmpC-Bildner kamen falsch negativ und zwei nicht auswertbar heraus.

Der β LACTATM-Test ist also nicht zuverlässig zum Nachweis von AmpC und diese Tatsache verminderte die Sensitivität des β LACTATM-Tests. Renvoise et al. evaluierten den β LACTATM-Test anhand von 2.387 klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten, durchgeführt in fünf französischen und belgischen Krankenhäusern. Als Referenzmethode verwendeten sie Disk Diffusion. Alle Isolate bis auf die negativen wurden in beiden Tests genotypisch mit Multiplex-PCR charakterisiert. Für alle Isolate zusammen ergab der Test eine Sensitivität von 87,7 % und eine Spezifität von 99,6 %, nur für *E. coli* und *K. pneumoniae* eine Sensitivität von 96 % und eine Spezifität von 100 %. Falsch negative Ergebnisse wurden auch auf AmpC-Bildner mit 3GC-Resistenz zurückgeführt (Renvoise et al., 2013).

Auch Morosini et al. evaluierten den Test anhand von 338 prospektiv gesammelten klinischen Isolaten und 106 molekular charakterisierten Isolaten mit β -Laktamase-vermittelter Resistenz gegen Breitspektrum-Cephalosporine. Alle Isolate wurden phänotypisch mit MicroScan-System und MALDI-TOF MS charakterisiert. Es ergab sich eine Sensitivität von 92,7 % und eine Spezifität von 100 %. Alle AmpC-Bildner (sowohl chromosomal AmpC-Hyperproduzenten als auch plasmid AmpC-Produzenten) ergaben falsch negative Ergebnisse und die meisten nicht-auswertbaren Ergebnisse waren auf VIM-1 Carbapenemase zurückzuführen (Morosini et al., 2014).

Bei Begrenzung vom Herstellerkriterium auf einzig den ESBL-Nachweis ergibt sich eine höhere Sensitivität von 99,4 % und eine vergleichbare Spezifität von 76,2 % (Tab. 14), denn 157 der 158 ESBL-positiven Isolate wurden im β LACTATM-Test positiv getestet und ein Isolat war β LACTATM-negativ. Von den 84 ESBL-negativen Isolaten waren 64 β LACTATM-negativ, 20 falsch positiv und drei nicht auswertbar.

Tab. 14: Sensitivität und Spezifität von β LACTA™-Test nach dem Kriterium ESBL-Nachweis. Drei ESBL-negative Isolate waren nicht auswertbar.

	β LACTA™		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL+	157	1	158
ESBL-	20	64	84
Σ	177	65	242

4.3 Der β LACTA™-Test ist viel spezifischer als der chromID® ESBL-Agar

Die Ergebnisse des β LACTA™-Tests nach dem alleinigen Kriterium „ESBL-Nachweis“ wurden mit chromID® ESBL verglichen. Für chromID® ESBL wurde eine noch bessere Sensitivität von 100 % aber eine wesentlich schlechtere Spezifität von 10,3 % ermittelt. Mit chromID® ESBL kann AmpC nicht abgegrenzt werden, weil das Screening mit chromID® ESBL allein auf dem Cefpodoxim-Gehalt des Nährbodens beruht. Das wurde auch in einer Studie von Färber et al. nachgewiesen, in der eine Sensitivität von 95,8 % und eine Spezifität von 10,5 % errechnet wurden, ziemlich ähnlich zu den hier errechneten (Färber et al., 2008). Aber auch in einer Studie von Glupczynski et al. in der eine Sensitivität von 97,9 % und eine Spezifität von 89 % errechnet wurden, wurde das gleiche beobachtet (Glupczynski et al., 2007).

Aliskan et al. evaluierten chromID® ESBL-Agar anhand von 672 Urinproben. Als Referenzmethode verwendeten sie Standard Combined Double-Disk Diffusion mit Ceftazidim- und Cefotaxim-Plättchen. Es ergaben sich eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 92,9 %. Sie zeigten auch, dass chromID® ESBL-Agar auch zum Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) geeignet ist. Dabei wurden 203 Enterokokken-Stämme, davon 118 Vancomycin-sensitiv, 85 Vancomycin-resistent, untersucht. Es ergaben sich eine Sensitivität von 97,6 % und eine Spezifität von 100 % (Aliskan et al., 2012).

Die Spezifität schwankt in den unterschiedlichen Studien sehr stark. Das hängt damit zusammen, dass auch ESBL-negative Stämme auf chromID® ESBL-Agar wachsen können, wenn sie resistent gegen Cefpodoxim sind, z.B. durch chromosomale Penicillinase, Cephalosporinase, AmpC oder Carbapenemase. Kasuga et al. evaluierten

chromID[®] ESBL-Agar anhand von 47 klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten (27 ESBL-positiv und 20 ESBL-negativ) mit Cefpodoxim-MHK >2 mg/L. Die Beta-Laktamase-Gene der Isolate wurden durch PCR charakterisiert. Es ergaben sich eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 20 % (Kasuga et al., 2009).

Daraus lässt sich folgern, dass der β LACTA[™]-Test zum ESBL-Screening viel spezifischer als chromID[®] ESBL-Agar ist und zum ESBL-Screening eingesetzt werden könnte.

4.4 Der β LACTA[™]-Test ist spezifischer als ESBL-Bestätigungstest vom VITEK[®] 2 und Phoenix[™] 100

Wie bereits erwähnt, wurden für den ESBL-Bestätigungstest des VITEK[®]2-Systems eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 64,8 % ermittelt.

Im Vergleich dazu wurde für den ESBL-Bestätigungstest des Phoenix[™]100-Systems trotz der schlechteren Sensitivität von 90,5 % eine bessere Spezifität von 74,4 % erzielt. Außerdem waren 16 Isolate in VITEK[®] 2 nicht auswertbar, während nur ein einziges Isolat im Phoenix[™]100-System nicht auswertbar war.

In allen Studien wurden unterschiedliche Ergebnisse für die Sensitivität und Spezifitäten der automatisierten VITEK[®]2- und Phoenix[™]100-Systeme berichtet. Dies ist u.a. auf die beteiligten Spezies zurückzuführen. Leverstein-van Hall et al., Menozzi et al. und Thomson et al. untersuchten nur *E.-coli*-, *K.-pneumoniae*- und *K.-oxytoca*-Isolate (Leverstein-van Hall et al., 2002; Menozzi et al., 2006; Thomson et al., 2007). Die von ihnen kalkulierten Spezifitäten waren deutlich höher als die hier berechneten. In einer Studie von Valenz et al. wurde die ESBL-spezifische VITEK[®]2-AST-N11-Karte zum Nachweis von ESBL in *E. coli*, *K. pneumoniae*, und *K. oxytoca* evaluiert; dabei erreichte der ESBL-Test von der VITEK[®]2-AST-N11-Karte eine Sensitivität von 92,1 % und eine Spezifität von 90 % (Valenza et al., 2011). *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, und andere Spezies sind jedoch auch in der Lage, ESBL zu bilden. Wiegand et al. wählten ein erweitertes Spektrum von *Enterobacteriaceae* (Wiegand et al., 2007). Die Autoren ermittelten mit dem Phoenix[™]100-System für alle getesteten Isolate eine Sensitivität von 98,8 % gegenüber 85,9 % mit dem VITEK[®]2-System. Das VITEK[®]2-System hatte eine Spezifität von 78 % für alle getesteten Stämme. Die Spezifität des Phoenix[™]100-Systems war 52,2 %. Wiegand et al. verwendeten ein Phoenix[™]-Panel, das nicht mehr vorhanden ist. In VITEK[®] 2 verwendeten sie keine ESBL-spezifische

Karte (AST-N020). Auch in einer Studie von Färber et al. wurde eine erweiterte Speziesverteilung gewählt. Dabei wurden drei VITEK®2-Karten, davon eine ohne (AST-N020) und zwei mit integriertem ESBL-Screening (AST-N041, AST-N062), miteinander verglichen und führten zu einer Steigerung der Sensitivität (von 78,8 % auf 84,2 %) (Färber et al., 2008).

Die jeweiligen Spezifitäten waren 55,6 %, 50 % und 50 %. Außerdem wurden zwei Phoenix™-Karten, NMIC/ID-50 und NMIC/ID-70, miteinander verglichen und zeigten Sensitivitäten von 77,1 % und 84,2 % und Spezifitäten von 61,5 % und 75 %.

In den meisten Studien wurden verschiedene Tests als Referenzmethoden verwendet, um den Verdacht auf ESBL-Bildung zu bestätigen. Zum Beispiel verwendeten Thomson et al. Enzymcharakterisierung als Referenzmethode. Menozzi et al. bestätigten ihre Ergebnisse mit einem Standard-Bouillon-Mikroverdünnung nach den CLSI-Richtlinien und Wiegand et al. verwendeten biochemische und molekulare Charakterisierungen.

Verglichen mit VITEK® 2 und Phoenix™ 100 konnte hier anhand des β LACTA™-Tests die beste Sensitivität und Spezifität erreicht werden. Der β LACTA™-Test könnte daher als ergänzendes Instrument bei der Erkennung und zum Nachweis von ESBL dienen.

4.5 Speziesspezifische Unterschiede in der ESBL-Detektion mit dem β LACTA™-Test

15 der 17 falsch positiven Isolate, die zur Verminderung der Spezifität führten, waren Piperacillin/Tazobactam-resistente *Klebsiella-spp.*-Stämme. Diese sind offensichtlich K1-Hyperproduzenten, die ein ähnliches Resistenzspektrum wie ESBL-Bildner und zusätzlich β -Laktamase-Inhibitor-Resistenz zeigen. Deshalb konnte mit dem β LACTA-Test zum Nachweis von ESBL bei *Klebsiella spp.* eine Sensitivität von 100 % aber nur eine Spezifität von 34,8 % ermittelt werden (Tab. 15).

Tab. 15: Sensitivität und Spezifität von β LACTATM-Test nach dem Kriterium ESBL-Nachweis für *Klebsiella* spp. Zwei ESBL-negative *Klebsiella*-Isolate waren nicht auswertbar.

	β LACTA TM		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL+	33	0	33
ESBL-	15	8	23
Σ	48	8	56

In der Studie von Renvoise et al. (2013) wurden auch falsch positive Ergebnisse u.a. auf K1-Hyperproduzenten zurückgeführt.

Bei *Klebsiella* spp. ist die Prävalenz der K1 und AmpC-Bildung hoch. Aber die ESBL-Aktivität konnte aber sehr genau in Piperacillin/Tazobactam-sensiblen *Klebsiella*-spp.-Isolaten vorhergesagt werden. Allerdings war die Zahl der Piperacillin/Tazobactam-sensiblen *Klebsiella*-spp.-Isolate in dieser Studie sehr gering (nur sechs *Klebsiella*-spp.-Isolate waren Piperacillin/Tazobactam-sensibel und weitere zehn intermediär).

Bei den *E.-coli*-Stämmen kamen alle 122 ESBL-bildenden Isolate β LACTA-positiv und alle ESBL-negativen bis auf einen AmpC-positiven Stamm negativ heraus. Damit wurde für den β LACTATM-Test zum Nachweis der ESBL-Bildung bei *E.-coli*-Stämmen eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 97,5 % ermittelt (Tab. 16).

Tab. 16: Sensitivität und Spezifität des β LACTATM-Tests nach dem Kriterium ESBL-Nachweis für *E. coli*.

	β LACTA TM		Σ
	Positiv	Negativ	
ESBL+	122	0	122
ESBL-	1	47	48
Σ	123	47	170

Verglichen mit anderen Methoden wurde in VITEK[®] 2 zum Nachweis ESBL-bildender *E. coli* eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 87,5 % und in PhoenixTM 100

eine vergleichbare Sensitivität von 97,5 % und eine identische Spezifität von 87,5 % ermittelt. Für chromID[®] ESBL wurde zum Nachweis ESBL-bildender *E. coli* eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von nur 2 % ermittelt.

Der β LACTA[™]-Test zeigte zum Nachweis ESBL-bildender *E. coli* die besten Ergebnisse und hat sich damit als brauchbarer Schnelltest zum Nachweis ESBL-bildender *E. coli*-Isolate erwiesen (Abb. 18).

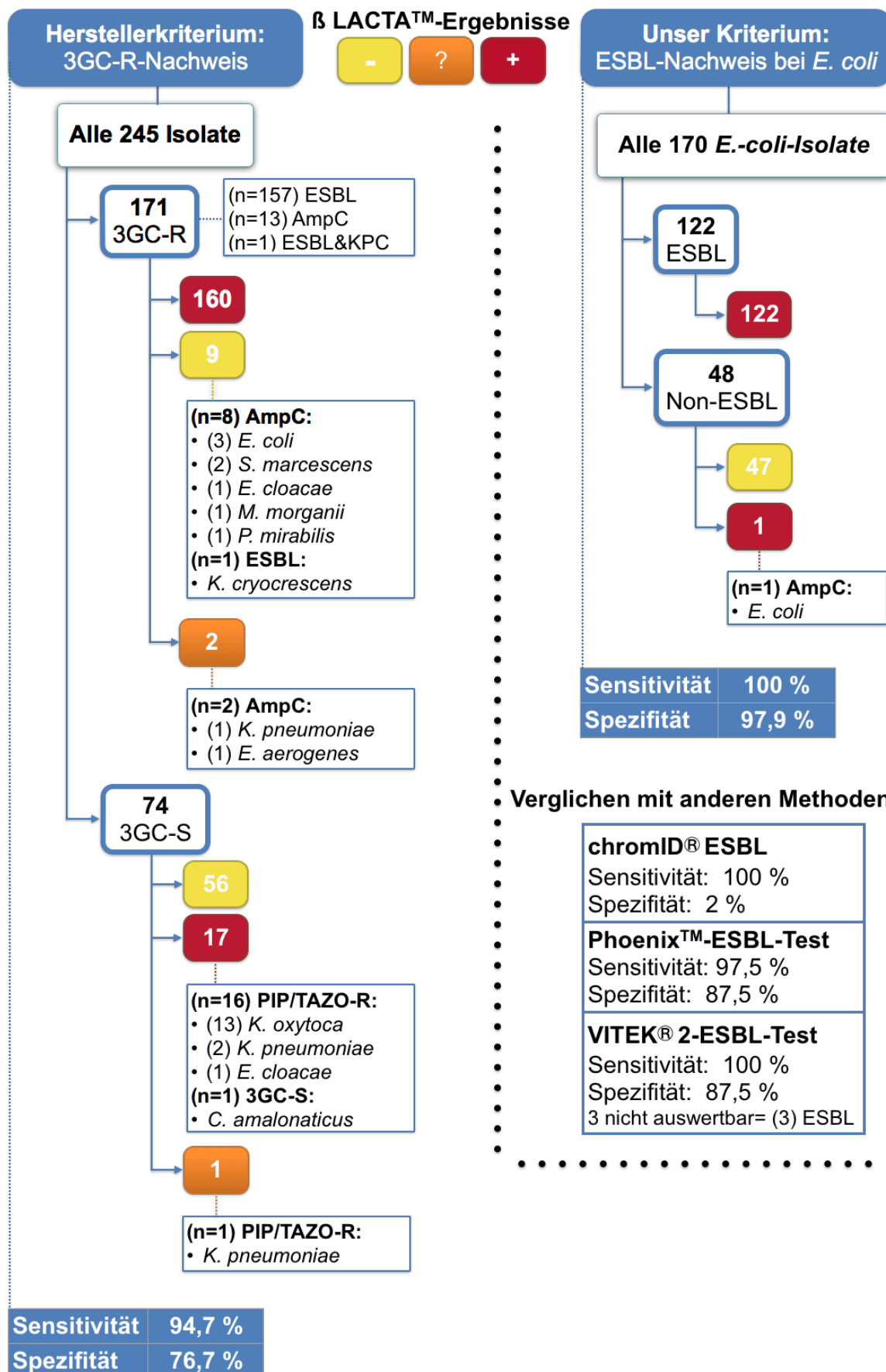


Abb. 18: Vergleich zwischen β LACTATM-Ergebnissen mittels verschiedener Kriterien. Herstellerkriterium: Nachweis von 3.GC-R beruhend auf der Bildung von β -Laktamasen [ESBL, Carbapenemasen (KPC, MBL) oder erworbener AmpC]. Unser Kriterium: ESBL-Nachweis in *E.-coli*-Stämmen. Dargestellt ist auch der Vergleich zwischen dem β LACTATM-Ergebnis anhand unseres Kriteriums und der anderen Methoden (chromID[®] ESBL, PhoenixTM100-ESBL-Test, und VITEK[®]2-ESBL-Test). 3GC= Cephalosporine der 3. Generation PIP/TAZO= Piperacillin/Tazobactam, R= resistent, S= sensibel, n= Zahl.

4.6 Genotypisierung anhand des reversen Hybridisierungskits

In einem Teil der Arbeit erfolgte eine Genotypisierung der Isolate im Hinblick auf das Vorkommen der verschiedenen ESBL-Typen mit der Frage nach dem Verhältnis der Genotypen zueinander.

Neben der einfachen Durchführung und der Beschleunigung der Diagnostik bzw. des Nachweises von ESBL innerhalb von ca. zwei bis vier Stunden, anstelle von 18-20 Stunden, wie dies im Rahmen eines E-Tests sonst üblich wäre, ist der Vorteil dieser Methode des Nachweises die direkte genetische Testung eines Bakteriums auf die Anwesenheit des die Resistenz vermittelnden Gens. Außerdem erfordert dieser Test abgesehen vom PCR-Cycler keine zusätzlichen speziellen Geräte und kostet der GenID Hybridisierungskit pro Test weniger als die Hälfte des Preises eines vergleichbaren Check-Points-Array (Wageningen, The Netherlands).

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität und Spezifität. In dieser Studie wurde eine Sensitivität von 99,4 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt.

Bloemberg et al. evaluierten diesen reversen Hybridisierungskit an 424 klinischen Stämmen und ermittelten 100 % Spezifität, und 100 % Sensitivität zum Nachweis von TEM und CTX-M aber 94,4 % zum Nachweis von SHV. Die geringere Spezifität zum Nachweis von SHV führen die Autoren auf die verwendeten SHV-PCR-Primer, mit denen SHV-Sequenzvarianten von *K. variicola* erkannt werden, zurück (Bloemberg et al., 2014).

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Menge der Proben auf elf (plus eine Negativkontrolle) beschränkt ist, während ein Array mehrere Proben enthalten kann. Zudem weist der Test bakterielle Resistenzgene nach, nicht jedoch Resistenzen, wie es bei unserem PCR-positiven, aber phänotypisch negativen *K. cryocrescens*-Isolat der Fall war. Da der Test nur zur Detektion des wichtigsten ESBL-Genotyps dient, ist es nicht auszuschließen, dass die dabei als negativ analysierten Stämme ESBL-Genotypen bilden, die nicht anhand des reversen Hybridisierungskits nachgewiesen werden

können, oder dass Inhibitoren im Probematerial die Qualität der extrahierten DNA beeinträchtigen und zu falsch negativen Ergebnissen in der PCR führen können. In unserer Studie gab es ein PCR-negatives *K.-oxytoca*-Isolat, das übereinstimmend in allen phänotypischen Bestätigungstests als ESBL-positiv nachgewiesen wurde. Deshalb sollten negative oder zumindest unklare Ergebnisse mit üblichen Testmethoden (wie z.B. Plattendiffusionstests oder E-Tests) überprüft oder sequenziert werden, was zeit- und kostenaufwendig ist.

Taq-Polymerasen können mit bakteriellen Resistenzgenen wie *tem*, *tet* oder *spc* kontaminiert sein (Perron et al., 2006; Song et al., 2006). Dies führte bei uns zu falsch positiven Signalen in Negativkontrollen, sodass das Durchprobieren von Taq-Polymerasen mehrerer Hersteller in Erwägung gezogen und durchgeführt wurde. Auch kam es bei einigen Proben zu teilweise schwachen Banden, was die Interpretation der Ergebnisse erschwerte.

Während diese Methode im Vergleich zum β LACTATM-Test viel zeit- und kostenaufwendiger ist, könnte mit letzterem genauso eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht werden, wenn der Test bei *E. coli* eingesetzt würde. Außerdem konnte auch keine Korrelation zwischen ESBL-Genotyp und VITEK[®]2-AST festgestellt werden.

In 69 der 72 Schweine-Isolate wurden bla-Gene nachgewiesen. 95,7 % (66/69) davon besaßen einen CTX-M-Typ. Die restlichen drei Isolate enthielten jeweils zwei bla-Gene. In einem Isolat wurden CTX-M und TEM AS 238 S, in einem SHV AS 238/240, und in einem anderen Isolat TEM AS 238 S und TEM AS 104 K nachgewiesen. Zwei der drei PCR-negativen Schweine-Isolate wurden AmpC-positiv getestet.

Auf der anderen Seite wurden nur in 88 der 173 Patienten-Isolate bla-Gene nachgewiesen. 93,2 % (82/88) davon besaßen einen CTX-M-Typ. In weiteren drei Isolaten trat CTX-M in Kombination mit SHV AS 238/240 auf. In den übrigen drei Isolaten wurden KPC und SHV AS 238/240, bzw. SHV AS 238/240, bzw. SHV AS179A nachgewiesen.

Es ist somit eine eindeutige Dominanz der CTX-M-Enzyme ersichtlich.

Mittlerweile sind zur Detektion verschiedener ESBL-Gene eine Vielzahl von zum Teil auch kommerziellen PCRs verfügbar.

4.7 Einsatzmöglichkeiten des β LACTATM-Tests

Der β LACTATM-Test stellt bei *E.-coli*-Isolaten zusammen mit 3GC-Resistenz in der antimikrobiellen Sensibilitätstestung einen zusätzlichen spezifischen ESBL-Test dar. Der Test könnte in einem schrittweisen Algorithmus in der Routinediagnostik eingesetzt werden. Abb. 19 zeigt einen Modellalgorithmus für die Verwendung des β LACTATM-Tests bei primären *Enterobacteriaceae*-Isolaten. Dieser Algorithmus kann leicht auf Blutkultur- und Urin-Isolate angewendet werden. Es ermöglicht dem Labor einen Verdacht auf 3GC-Resistenz mit einer Sensitivität von 89,7 % zu einem frühen Zeitpunkt zu melden und sorgt damit für therapeutisch relevante Informationen zur Frühanpassung der antibiotischen Therapie. Zudem kann der Test mit hoher Spezifität zur Bestätigung der Ergebnisse des ESBL-Tests der automatisierten Analysesysteme bei *E.-coli*- und Piperacillin/Tazobactam-sensiblen *Klebsiella-spp.*-Isolaten eingesetzt werden.

Das würde es ermöglichen, die Antibiotika-Therapie früher umzustellen oder anzupassen und gezielte hygienische Maßnahmen früher einzuleiten und folglich die Kosten zu senken bzw. die Verweildauer abzukürzen. Dabei könnte der Test dazu beitragen, im Falle eines negativen Ergebnisses die Verwendung von "last-line" wie beispielsweise Carbapeneme zu vermeiden. Im Falle eines positiven Tests kann dieser Zeitfaktor insbesondere im Rahmen einer *E.-coli*-Sepsis von entscheidender Bedeutung sein. Hier kann sich die üblicherweise gewählte empirische antibiotische Therapie als unwirksam erweisen. Dies wird auch als einer der Gründe für die signifikant erhöhte Letalität einer durch ESBL-positive *E. coli* verursachten Sepsis im Vergleich zu einer durch ESBL-negative *E. coli* verursachten Sepsis angesehen werden (Kang et al., 2010; Melzer and Petersen, 2007).

Der Test kann auch zum Screening auf ESBL in Kliniken angewendet werden. Denn der Test hat eine viel bessere Spezifität als das ESBL-Chromagar gezeigt, das standardmäßig zum ESBL-Screening benutzt wird.

Für den β LACTATM-Test können nicht direkt Isolate aus dem ESBL-Chromagar genommen werden, denn sie sind bunt und machen das Ablesen des β LACTA-Tests kaum noch möglich.

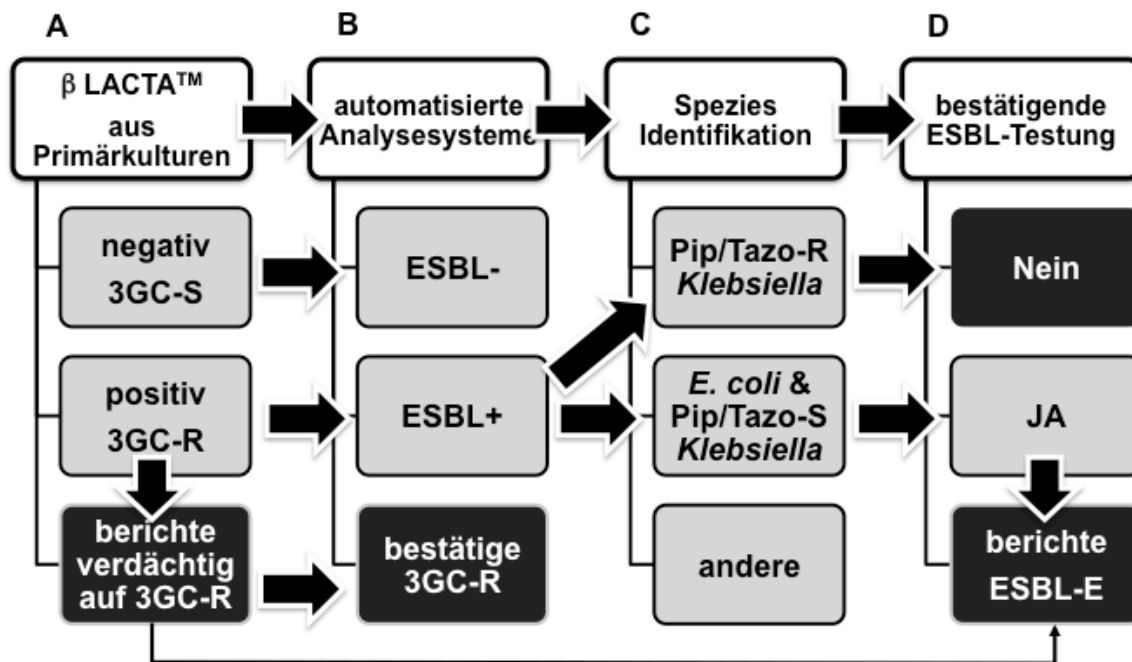


Abb. 19: Algorithmus für diagnostische Verwendung eines chromogenen 3GC-R-Tests in der Berichterstattung der ESBL-E. Die Abbildung zeigt die Integration des chromogenen 3GC-R-Tests bei der Früherkennung von 3GC-R in Primärkulturen (links): Verdacht auf 3GC-R (β LACTA oder Vergleichstest positiv (A)) wird durch automatisierte Analysesysteme (AST) bestätigt (B). Es erweitert ferner die Verwendung des chromogenen 3GC-R-Tests als ESBL-Bestätigungstest: wenn AST (B) ein positives Ergebnis für 3GC-R und ESBL-Screen liefert und wenn Isolate *E. coli* oder Piperacillin/Tazobactam-sensible (Pip/Tazo-S)-*Klebsiella*-spp. sind (C). Der β LACTA™-Test kann zur Bestätigung von ESBL (D) verwendet werden. Die Zuverlässigkeit des β LACTA™-Tests ist bei Piperacillin/Tazobactam-resistenten (Pip/Tazo-R) *Klebsiella* spp. vermindert und somit nicht zu empfehlen. Andere *Enterobacteriaceae*-Arten müssen evaluiert werden.

4.8 Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam als Carbapenem-Alternative gegen ESBL-positive *E.-coli*-Infektionen

Wie bereits in Abschnitt 1.2.5 erwähnt, gelten Carbapeneme als Mittel der Wahl zur Therapie von Infektionen mit ESBL-E. Anhand der mit VITEK® 2 ermittelten MHK-Werte gemäß den EUCAST-Richtlinien (<4 mg/L) zeigten 153 der 158 (96,8 %) ESBL-positiven Isolate Sensibilität gegenüber Imipenem. Alle 122 ESBL-positiven *E.-coli*-Isolate bis auf eines (99,2 %) erwiesen sich als sensibel gegenüber Imipenem, davon 120 (99,2 %) mit $\text{MHK} \leq 0,25$ mg/L, und alle bis auf vier der 33 (87,9 %) ESBL-positiven *Klebsiella*-spp.-Isolate waren Imipenem-sensibel, davon 22 (75,9 %) mit $\text{MHK} \leq 0,25$ mg/L.

Auf der anderen Seite zeigten, wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, nur 48,1 % aller

ESBL-positiven Isolate Resistenz gegenüber Ceftazidim, und 70,3 % zeigten Sensibilität gegenüber Piperacillin/Tazobactam.

Während 59 der 122 (48,4 %) ESBL-positiven *E.-coli*-Isolate Ceftazidim-sensibel gemäß den EUCAST-Richtlinien (<4 mg/L) waren, davon 55 (93,2 %) mit MHK ≤ 1 mg/L, erwies sich nur eines der 33 (3%) ESBL-positiven *Klebsiella-spp.*-Isolate als sensibel gegenüber Ceftazidim.

106 der 122 (86,9 %) ESBL-positiven *E.-coli*-Isolate erwiesen sich als sensibel gegenüber Piperacillin/Tazobactam gemäß den EUCAST-Richtlinien (<16 mg/L), davon 88 (83 %) mit MHK ≤ 4 mg/L, während nur drei der 33 (9,1 %) ESBL-positiven *Klebsiella-spp.*-Isolate gegenüber Piperacillin/Tazobactam sensibel waren, davon ein Isolat ≤ 4 mg/L (Abb. 20) (Tab. 17).

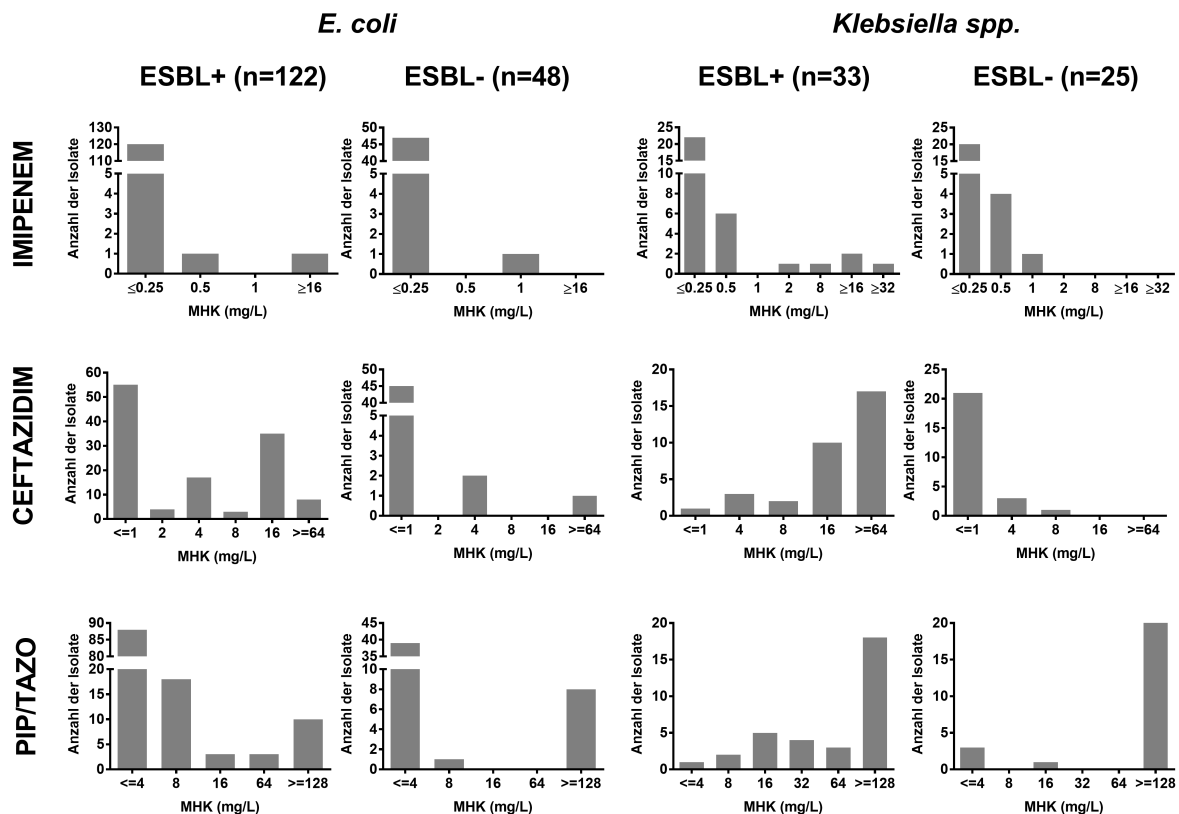


Abb. 20: Die mit VITEK[®] 2 ermittelten MHK-Werte (Imipenem, Ceftazidim, Pip/Tazo) von *E. coli* im Vergleich zu *Klebsiella spp.* und jeweils ESBL-positive im Vergleich zu ESBL-negativen Isolaten.

Tab. 17: Anzahl und Anteile der sensiblen ESBL-positiven *E.-coli*- und *Klebsiella-spp.*-Isolate gegenüber Imipenem (MHK <4 mg/L), Ceftazidim (MHK <4 mg/L) und Piperacillin/Tazobactam (<16 mg/L) (anhand der mit VITEK® 2 ermittelten MHK-Werte gemäß den EUCAST-Richtlinien).

Antibiotikum	ESBL+ <i>E. coli</i> (n=122)	ESBL+ <i>Klebsiella spp.</i> (n=33)
Imipenem	n= 121 (99,2 %)	n= 29 (87,9 %)
Ceftazidim	n=55 (45,1 %)	n= 3 (9,1 %)
Pip/Tazo	n=106 (86,9 %)	n=1 (3 %)

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Piperacillin/Tazobactam im Vergleich zu Ceftazidim die bessere Carbapenem-Alternative gegen ESBL-positive *E.-coli*-Infektionen darstellt, während gegen ESBL-positive *Klebsiella-spp.*-Infektionen weder Ceftazidim noch Piperacillin/Tazobactam als Carbapenem-Alternative zu funktionieren scheint.

Eine Veröffentlichung von Rodriguez-Bano et al. ergab ein ähnliches Ergebnis. Die Autoren untersuchten die Ergebnisse von 43 Bakteriämie-Episoden, die durch ESBL-produzierende *E.-coli*-Stämme (vor allem CTX-M-14) verursacht wurden. Die Mortalität war niedriger, wenn die Patienten eine β -Laktam- β -Laktamase-Inhibitor-Kombination oder Carbapenem erhielten, verglichen mit entweder einem Cephalosporin oder Fluorchinolon (9 % gegenüber 35 %, p 0,05). In dieser Reihe war die *E.-coli*-Sensibilität 100 % gegenüber Meropenem, 95 % gegenüber Piperacillin/Tazobactam, 26 % gegenüber Ciprofloxacin und 0 % gegenüber Cephalosporinen (Rodriguez-Bano et al., 2006).

Gavin et al. untersuchten die Auswirkung der Verwendung von β -Laktam- β -Laktamase-Inhibitoren bei Patienten mit ESBL-produzierenden *E.-coli*- und *Klebsiella-spp.*-Stämmen aus sieben medizinischen Zentren in ganz Nordamerika. Insgesamt wurden 148 Patientenakten überprüft, wobei 30 % dieser Patienten ein Fluorchinolon, 18 % ein Carbapenem, 16 % Piperacillin/Tazobactam, 9 % andere β -Laktam-Antibiotika, 7 % Ampicillin-Sulbactam, 6 % Aminoglykoside, und 6 % Trimethoprim-Sulfamethoxazol bekamen. Von diesen Patienten erhielten 83 % Monotherapie. 23 Patienten erhielten Piperacillin/Tazobactam, und von diesen hatten 17 Infektionen außerhalb der

Harnwege. Für Infektionen, bei denen der Organismus eine MHK für Piperacillin/Tazobactam von ≤ 16 mg / l benötigt (der aktuelle Sensibilität-Grenzwert), wurde ein erfolgreiches Ergebnis in 14 von 15 Fällen berichtet, darunter zehn der elf Nicht-Harnwegsinfektionen. Nur eine von fünf Nicht-Harnwegsinfektionen reagierte, wenn das Piperacillin/Tazobactam-MHK > 16 mg / L war. Die Autoren schließen auch die interessante Beobachtung ein, dass Meropenem-Therapie in nur zwei von vier Piperacillin/Tazobactam-resistenten Infektionen erfolgreich war, was zeigt, dass auch die Carbapeneme nicht einheitlich wirksam bei der Behandlung von Nicht-Harnwegsinfektionen sind, die durch ESBL-produzierende Bakterien verursacht werden (Gavin et al., 2006).

Das zeigt, dass das Vertrauen auf die Ergebnisse der *in-vitro*-Sensibilität neue Therapiemöglichkeiten eröffnen könnte und den Einsatz von Breitspektrum-Reserveantibiotika wie Carbapeneme reduzieren könnte. Im Blick auf die rasche Entstehung von Carbapenemasen ist jede therapeutische Alternative eine Option, die unter ernsthaften Überlegungen erwägt werden sollte.

5. Zusammenfassung

Gemäß der EUCAST-Richtlinien wird die Empfindlichkeit gegenüber β -Laktam-Antibiotika so an die Klinik berichtet wie sie im mikrobiologischen Labor gemessen wurde. Es ist jedoch ein aktueller Gegenstand der Diskussion, ob *in-vitro*-Sensibilität gegen Cephalosporine auch *in-vivo*-Wirksamkeit bedeutet. Die Unwirksamkeit der ersten Antibiotikaregime durch ESBL-Bildung verlängert den klinischen Verlauf und verschlechtert die Prognose. Ein früher und verlässlicher Nachweis von ESBL-produzierenden Organismen ist daher eine diagnostische und therapeutische Priorität. Der chromogene β LACTATM-Test (Hersteller: Bio-Rad) bietet einen schnellen Nachweis von ESBL, AmpC und Carbapenemase-vermittelte Resistenz basierend auf dem Nachweis der Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation. In der vorliegenden Arbeit wurde der Test auf seine Anwendbarkeit als Voraussage- und / oder Bestätigungstest für ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* in der mikrobiologischen Routinediagnostik untersucht.

Eine Stammsammlung von 245 klinischen und veterinären *Enterobacteriaceae*-Isolaten wurde hierfür untersucht (170 *E. coli*, 58 *Klebsiella spp.* und 17 Isolate anderer Spezies). Die Ergebnisse der ESBL-Prüfung mit VITEK[®] 2 (Biomerieux), PhoenixTM 100 (Becton Dickinson), chromID[®] ESBL (bioMérieux) und ESBL-Genotypisierung (GenID) wurden mit dem β LACTATM-Test verglichen und bei Bedarf mit dem klassischen kulturbasierten Plattendiffusionstest und E-Test kontrolliert. Die Verteilung der genetisch bestätigten ESBL-Enzyme war wie folgt: Human 88/173, Schwein 69/72.

Die Daten zeigten, dass der β LACTATM-Test einfach anzuwenden und, ungeachtet der Herkunft der Isolate oder des ESBL-Genotyps, sehr zuverlässig bei der Erfassung von Cefotaxim- und Cefpodoxim-Resistenz nach EUCAST-Grenzwerten ist. Keine Korrelation konnte mit der Empfindlichkeit oder Resistenz gegen Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam nachgewiesen werden, obwohl häufig ESBL-Aktivität mit Resistenz auch gegenüber diesen Substanzen gleichgesetzt wird. Darüber hinaus wurden alle ESBL-bildenden Isolate bis auf ein nur genetisch nachgewiesenes ESBL-positives, phänotypisch ESBL-negatives Isolat erkannt (Sensitivität für den ESBL-Nachweis 99,4 %, Spezifität 76,2 %). Die AmpC-Erkennung hingegen lag bei unter 28 %. Auffallend war allerdings, dass mit dem β LACTATM-Test Piperacillin/Tazobactam-resistente *Klebsiella spp.* (K1) nicht von ESBL-tragenden *Klebsiella spp.* unterschieden

werden konnten. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass positive ESBL-Testergebnisse des PhoenixTM100-Systems weniger akkurat sind als jene des VITEK[®]2-Systems und des β LACTATM-Tests.

Insgesamt heben unsere Daten die hohe Zuverlässigkeit des β LACTATM-Tests zur Vorhersage von ESBL-tragenden *E.-coli*-Stämmen hervor. Der Test kann des Weiteren verwendet werden, um den ESBL-Nachweis in VITEK[®] 2 oder PhoenixTM 100 zu bestätigen.

6. Anhang

Tab. 18: Spezies-spezifische Verteilung von ESBL, AmpC und K1.

* K1-verdächtig wegen PIP/TAZO-Resistenz.

** ein Isolat enthält auch KPC

Spezies	#	ESBL		AmpC		K1*	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
<i>Escherichia coli</i>	170	122 (71,8 %)	48 (28,2 %)	4 (2,4 %)	166 (97,6 %)	5 (2,9 %)	165 (96,1 %)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	31** (77,5 %)	9 (22,5 %)	1 (2,5 %)	39 (97,5 %)	4 (10 %)	36 (90 %)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	2 (11,1 %)	16 (88,9 %)	0	18 (100 %)	15 (83,3 %)	3 (16,7 %)
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	0	4 (100 %)	2 (50 %)	2 (50 %)	0	4 (100 %)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	2 (100 %)	1 (50 %)	1 (50 %)	0	2 (100 %)
<i>Serratia marcescens</i>	3	0	3 (100 %)	2 (67 %)	1 (33 %)	0	3 (100 %)
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0	3 (100 %)	2 (67 %)	1 (33 %)	0	3 (100 %)
<i>Morganella morganii</i>	1	0	1 (100 %)	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)
Total	245	158	87	13	232	24	221

Tab. 19: β LACTA™-, VITEK®2- und Phoenix™100-Ergebnisse der untersuchten Isolate

Spezies	#	VITEK® 2			Phoenix™ 100			β LACTA™		
		positiv	negativ	n.a.	positiv	negativ	n.a.	positiv	negativ	n.a.
<i>Escherichia coli</i>	170	125 (73,5 %)	42 (24,7 %)	3 (1,8 %)	125 (73,5 %)	45 (26,5 %)	0	123 (72,4 %)	47 (27,6 %)	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	30 (75 %)	5 (12,5 %)	5 (12,5 %)	25 (62,5 %)	15 (37,5 %)	0	33 (82,5 %)	5 (12,5 %)	2 (5 %)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	16 (89 %)	1 (5,5 %)	1 (5,5 %)	13 (72,2 %)	4 (22,2 %)	1 (5,6)	15 (83,3 %)	3 (16,7 %)	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	0	1 (25 %)	3 (75 %)	1 (25 %)	3 (75 %)	0	2 (50 %)	2 (50 %)	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	0	2 (100 %)	0	2 (100 %)	0 (50 %)	0	1 (50 %)	1 (50 %)
<i>Serratia marcescens</i>	3	0	0	3 (100 %)	0	3 (100 %)	0	0	3 (100 %)	0
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0	0	3 (100 %)	0	3 (100 %)	0	1 (33 %)	2 (67 %)	0
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)	0 (100 %)	0	1 (100 %)	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	0
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	0	1 (100 %)	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)	0	0
Total	245	172	49	24	165	79	1	177	65	3

n.a.: nicht auswertbar.

Tab. 20: Im Rahmen der Dissertation untersuchte Isolate. Angegeben sind die laufende Nummer, die Ergebnisse des β LACTATM-Tests, Phänotypen [Spezies (VITEK[®] MS) und die Ergebnisse des VITEK[®] 2-ESBL-, PhoenixTM100-ESBL-Tests, und von chromID[®] ESBL], Genotypen (GenID-Ergebnis) und die Ergebnisse der Bestätigungstests (Plattendiffusionstest und E-Test).

Laufende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA-Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
1	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
2	+	PM	?	-	+	-	AmpC	-	-
3	+	KP	+	+	+	CTX-M			
4	-	EC	+	+	+	-	-	-	-
5	+	EC	+	+	+	CTX-M			
6	+	Pag	?	-	+	CTX-M			
8	-	KP	+	-	-	-	-	-	-
9	+	KP	+	+	+	CTX-M			
10	+	KP	+	+	+	CTX-M			
11	+	EC	+	+	+	CTX-M			
12	+	KP	+	-	+	CTX-M			
13	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
14	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
15	+	EC	+	+	+	CTX-M			
16	+	KP	+	+	+	CTX-M			
17	+	EC	+	+	+	CTX-M			
18	+	EC	+	+	+	CTX-M			
19	+	KP	+	-	+	CTX-M, SHV ^{AS 238/240}			
21	-	KO	+	+	+	-	-	?	-
23	+	EC	+	+	+	CTX-M			
24	-	KP	+	+	+	-	-	-	-
30	+	EC	+	+	+	CTX-M			
31	+	EC	+	+	+	CTX-M			
32	+	EC	+	+	+	CTX-M			
33	+	KP	+	+	+	CTX-M			
34	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
36	-	KO	+	-	+	-	?	-	-
37	-	EC	+	-	+	-	-	-	-

Laufende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA-Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
38	+	KP	+	+	+	CTX-M			
40	?	EA	?	-	+	-	AmpC	-	?
41	-	SM	?	-	+	-	AmpC	-	-
42	-	KP	+	-	-	-	-	-	-
43	+	KP	+	+	+	CTX-M			
44	+	EC	+	+	+	CTX-M			
46	+	KP	+	+	+	CTX-M			
47	-	ECLO	?	-	+	-	AmpC	-	-
48	+	EC	+	+	+	CTX-M			
49	+	EC	+	+	+	CTX-M			
50	-	MM	?	-	+	-	AmpC	-	-
53	+	EC	+	+	+	CTX-M			
54	+	KP	+	+	+	CTX-M			
55	+	EC	+	+	+	CTX-M			
56	+	KP	+	+	+	CTX-M			
57	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
58	-	PM	?	-	+	-	AmpC	-	?
59	+	EC	+	+	+	CTX-M			
60	+	EC	+	+	+	CTX-M			
62	+	KO	+	-	+	-	-	-	-
70	+	EC	-	-	+	-	AmpC	-	?
71	+	KP	+	+	+	CTX-M			
72	+	KO	+	-	+	-	-	-	-
73	+	KP	+	+	+	CTX-M			
74	+	KP	+	+	+	CTX-M, SHV ^{AS 238/240}			
75	+	CitFr	+	+	+	CTX-M			
78	+	EC	+	+	+	CTX-M			
79	+	EC	+	+	+	SHV ^{AS1/9 A}			
81	+	EC	+	+	+	CTX-M			

Laufende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA-Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
82	+	KO	+	?	+	-	-	-	-
83	+	EC	+	+	+	CTX-M			
86	+	KP	+	-	+	CTX-M			
89	-	KP	-	-	-	-	?	-	-
90	+	KP	?	-	+	CTX-M			
91	?	KP	?	+	+	-	?	-	-
92	+	EC	+	+	+	CTX-M			
95	+	ECLO	?	-	+	-	AmpC	-	-
97	+	EC	+	+	+	CTX-M			
98	+	EC	+	+	+	CTX-M			
100	+	KP	+	+	+	-	-	-	+
104	+	ECLO	+	+	+	-	-	-	-
106	+	EC	+	+	+	CTX-M			
107	-	ECLO	?	-	+	-	-	-	-
113	+	EC	+	+	+	CTX-M			
114	+	EC	+	+	+	CTX-M			
115	-	EC	+	+	+	-	-	-	-
116	+	EC	+	+	+	CTX-M			
117	+	KP	+	-	+	CTX-M			
120	+	EC	+	+	+	CTX-M			
125	+	KP	+	+	+	CTX-M			
126	+	KP	+	+	+	CTX-M			
127	+	KP	+	+	+	CTX-M			
129	+	KP	+	+	+	CTX-M			
130	+	EC	+	+	+	CTX-M			
131	+	EC	+	+	+	CTX-M			
132	+	EC	+	-	+	CTX-M			
133	-	EC	+	+	-	-	AmpC	-	-
134	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
135	+	KO	+	+	+	CTX-M			
136	+	EC	+	+	+	CTX-M			
137	+	EC	+	+	+	CTX-M			

Laufende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA-Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
138	+	KP	?	+	+	CTX-M			
139	-	EC	+	+	+	-	?	-	-
142	-	SM	?	-	+	-	AmpC	-	?
143	+	EC	+	+	+	CTX-M			
144	+	KP	+	-	+	CTX-M			
150	+	KP	+	+	+	CTX-M			
151	+	EC	?	+	+	CTX-M			
152	+	KP	+	-	+	CTX-M			
153	+	KP	-	-	+	KPC, SHV ^{AS 238/240}			
154	+	KP	+	-	+	CTX-M			
155	+	EC	?	-	+	SHV ^{AS 238/240}			
158	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
159	+	EC	+	+	+	CTX-M			
161	+	KO	?	+	+	-	-	-	-
162	+	EC	+	+	+	CTX-M			
163	+	EC	+	+	+	CTX-M			
165	+	KP	?	+	+	-	-	-	-
166	+	KP	?	+	+	CTX-M			
167	+	EC	+	+	+	CTX-M			
168	+	KO	+	+	+	-	ESBL	+	+
170	-	SM	?	-	-	-	?	-	-
172	-	PM	?	-	-	-	-	-	-
173	-	KP	-	-	-	-	-	-	-
175	-	KO	-	-	-	-	-	-	-
179	?	KP	-	-	+	-	AmpC	-	?
180	+	EC	+	+	+	CTX-M			
181	+	EC	?	+	+	CTX-M			
182	+	KP	+	+	+	CTX-M, SHV ^{AS 238/240}			
183	+	EC	+	+	+	CTX-M			
184	+	KO	+	+	+	-	-	-	-

Lauf- ende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA- Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
185	+	KO	+	+	+	-	-	-	-
186	-	EA	?	-	-	-	?	-	-
187	+	EC	+	-	+	CTX-M			
188	+	KP	-	-	+	CTX-M			
189	+	EC	+	+	+	CTX-M			
190	+	CA	?	-	+	-	-	-	-
191	+	EC	+	+	+	CTX-M			
192	+	EC	+	+	+	CTX-M			
193	-	KC	?	-	+	CTX-M	-	-	-
e1	-	EC	-	-	+	-	-		
e10	-	EC	-	-	+	-	-		
e11	-	EC	-	-	+	-	-		
e12	+	EC	+	+	+	CTX-M			
e13	-	EC	-	-	+	-	-		
e14	-	EC	-	-	+	-	-		
e15	-	EC	-	-	+	-	-		
e16	-	EC	-	-	+	-	-		
e17	-	EC	-	-	+	-	-		
e18	-	EC	-	-	+	-	-		
e19	+	EC	+	+	+	CTX-M			
e2	-	EC	-	-	+	-	-		
e20	+	EC	+	+	+	CTX-M			
e21	-	EC	-	-	+	-	-		
e22	-	EC	-	-	+	-	-		
e23	-	EC	-	-	+	-	-		
e24	-	EC	-	-	+	-	-		
e25	+	EC	+	+	+	CTX-M			
e26	-	EC	-	-	+	-	-		
e27	-	EC	-	-	+	-	-		
e28	-	EC	-	-	+	-	-		
e29	-	EC	-	-	+	-	-		
e3	-	EC	-	-	+	-	-		

Laufende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA-Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
e30	-	EC	-	-	+	-	-		
e31	-	EC	-	-	+	-	-		
e32	-	EC	-	-	+	-	-		
e33	-	EC	-	-	+	-	-		
e34	-	EC	-	-	+	-	-		
e35	-	EC	-	+	+	-	-		
e36	-	EC	-	-	+	-	-		
e37	-	EC	-	-	+	-	-		
e38	-	EC	-	-	+	-	-		
e39	-	EC	-	-	+	-	-		
e4	-	EC	-	-	+	-	-		
e40	-	EC	-	-	+	-	-		
e41	+	EC	+	+	+	CTX-M			
e42	-	EC	-	-	+	-	-		
e43	-	EC	-	-	+	-	-		
e44	-	EC	-	-	+	-	-		
e45	-	EC	-	-	+	-	-		
e5	-	EC	-	-	+	-	-		
e6	-	EC	-	-	+	-	-		
e7	+	EC	+	+	+	CTX-M			
e8	-	EC	-	-	+	-	-		
e9	-	EC	-	-	+	-	-		
s1	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s10	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s11	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s12	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s13	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s14	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s15	-	EC	-	+	+	-	AmpC	-	-
s16	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s17	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s18	+	EC	+	+	+	CTX-M			

Laufende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA-Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
s19	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s2	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s20	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s21	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s22	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s23	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s24	-	EC	-	-	+	-	AmpC	-	-
s25	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s26	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s27	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s28	+	EC	+	+	+	SHV ^{AS 238/240}			
s29	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s3	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s30	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s31	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s32	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s33	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s34	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s35	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s36	+	EC	+	+	+	TEM ^{AS 238 S} TEM ^{AS 104 K}			
s37	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s38	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s39	+	EC	+	+	+	CTX-M, TEM ^{AS 238 S}			
s4	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s40	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s41	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s42	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s43	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s44	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s45	+	EC	+	+	+	CTX-M			

Lauf- ende Nr.	***	Phänotyp				Genotyp	Bestätigungstests		
	β LACTA- Test	VITEK MS: Spezies	VITEK2: ESBL	Phoenix100: ESBL	chromID ESBL	GenID: ESBL-Typ	AmpC&ESBL Detection Discs	Cefpodoxim ESBL ID Disc Set	ETEST ESBL
s46	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s47	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s48	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s49	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s5	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s50	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s51	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s52	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s53	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s54	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s55	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s56	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s57	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s58	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s59	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s6	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s60	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s61	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s62	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s63	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s64	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s65	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s66	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s67	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s68	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s69	-	EC	+	-	+	-	?	?	-
s7	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s70	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s71	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s72	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s8	+	EC	+	+	+	CTX-M			
s9	+	EC	+	+	+	CTX-M			

6.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Phänotypische Merkmale unterschiedlicher β -Laktamasen	16
Tab. 2: Häufigkeit der verschiedenen ESBL-Varianten bei deutschlandweit gesammelten nosokomialen <i>E. coli</i> in den Jahren 2004, 2008 und 2011 (Pfeifer and Eller, 2012).....	20
Tab. 3: Zur Erstellung der Arbeit verwendete Geräte	26
Tab. 4: Zur Erstellung der Arbeit im Labor verwendete Reagenzien und Materialien ...	27
Tab. 5: Spezies der untersuchten Isolate	29
Tab. 6: Identifizierung der häufigsten <i>Enterobacteriaceae</i> mittels chromID® ESBL.....	31
Tab. 7: Versuchsansätze der PCR. Aufgelistet sind die benutzten Reagenzien mit entsprechenden Mengen	34
Tab. 8: Temperatur und Zeiten der PCR. Angegeben sind die Temperaturen und Zeiten der PCR in Abhängigkeit von der Zyklusphase.....	34
Tab. 9: Sensitivität und Spezifität von GenID-PCR.....	45
Tab. 10: Sensitivität und Spezifität des VITEK®2-ESBL-Tests	49
Tab. 11: Sensitivität und Spezifität des Phoenix™100-ESBL-Tests	50
Tab. 12: Sensitivität und Spezifität von chromID® ESBL.....	51
Tab. 13: Sensitivität und Spezifität des β LACTA™-Tests nach Herstellerkriterium.....	52
Tab. 14: Sensitivität und Spezifität von β LACTA™-Test nach dem Kriterium ESBL- Nachweis.....	57
Tab. 15: Sensitivität und Spezifität von β LACTA™-Test nach dem Kriterium ESBL- Nachweis für <i>Klebsiella spp</i>	60
Tab. 16: Sensitivität und Spezifität des β LACTA™-Tests nach dem Kriterium ESBL- Nachweis für <i>E. coli</i>	60
Tab. 17: Anzahl und Anteile der sensiblen ESBL-positiven <i>E.-coli</i> - und <i>Klebsiella-spp.</i> - Isolate gegenüber Imipenem, Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam	68
Tab. 18: Spezies-spezifische Verteilung von ESBL, AmpC und K1.	72
Tab. 19: β LACTA™-, VITEK®2-, Phoenix™100-Ergebnisse der untersuchten Isolate..	73
Tab. 20: die Untersuchungsergebnisse der im Rahmen der Dissertation untersuchte Isolate.....	74

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Einteilung der β -Laktamasen nach dem Ambler-Schema	13
Abb. 2: Resistenzrate gegen Cephalosporine der dritten Generation bei <i>E. coli</i> und <i>K. pneumoniae</i> in Deutschland im Zeitraum 2005-2014 (ECDC, 2015).....	19
Abb. 3: Spezies der untersuchten Isolate	30
Abb. 4: Auswertebogen des GenID reversen Hybridisierungskits mit Kontroll- und Markerzonen auf dem Nitrocellulosestreifen	36
Abb. 5: Cefpodoxim ESBL ID Disc Set. Die ESBL-Bildung ist nicht nachweisbar.....	38
Abb. 6: AmpC & ESBL Detection Discs. Der ESBL-Nachweis ist negativ und der AmpC-Nachweis ist positiv	39
Abb. 7: E-Test-Streifen mit Ceftazidim (TZ) / Ceftazidim+Clavulansäure (TZL). Der ESBL-Nachweis ist negativ	40
Abb. 8: Prozedur und Interpretation des β LACTA TM -Tests.....	41
Abb. 9: Die Arbeitsschritte und -methoden.....	42
Abb. 10: Übersicht der ESBL-Genotypen	44
Abb. 11: Vorkommen von ESBL und AmpC in den untersuchten Isolaten als Endergebnis aller phänotypischen und genotypischen Untersuchungen	46
Abb. 12: Die mit VITEK [®] 2 ermittelten MHK-Werte (Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidim) von ESBL-positiven im Vergleich zu ESBL-negativen Isolaten.....	48
Abb. 13: Ergebnis des VITEK [®] 2-ESBL-Tests.....	49
Abb. 14: Ergebnis des PHOENIX TM 100-ESBL-Tests	50
Abb. 15: Ergebnis von chromID [®] ESBL.....	51
Abb. 16: Ergebnis des β LACTA TM -Tests	52
Abb. 17: MHK-Vergleich zwischen β LACTA TM -positiven und β LACTA TM -negativen Isolaten.....	55
Abb. 18: Vergleich zwischen β LACTA TM -Ergebnissen mittels verschiedener Kriterien	63
Abb. 19: Algorithmus für diagnostische Verwendung eines chromogenen 3GC-R-Tests in der Berichterstattung der ESBL-E	66
Abb. 20: Die mit VITEK [®] 2 ermittelten MHK-Werte (Imipenem, Ceftazidim, Pip-Tazo) von <i>E. coli</i> im Vergleich zu <i>Klebsiella spp.</i> und jeweils ESBL-positive im Vergleich zu ESBL-negativen Isolaten	67

7. Literaturverzeichnis

Agerso, Y., F. M. Aarestrup, K. Pedersen, A. M. Seyfarth, T. Struve and H. Hasman, 2012, Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother* 67, 582-588.

Aliskan, H. E., S. Colakoglu, T. Turunc and Y. Z. Demiroglu, 2012, [Evaluation of the ChromID ESBL agar for the detection of ESBL-positive Enterobacteriaceae and vancomycin-resistant enterococcus isolates from urine cultures]. *Mikrobiyol Bul* 46, 17-25.

Ambler, R. P., 1980, The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289, 321-331.

Blanc, V., R. Mesa, M. Saco, S. Lavilla, G. Prats, E. Miro, F. Navarro, P. Cortes and M. Llagostera, 2006, ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* 118, 299-304.

Bloemberg, G. V., S. Polsfuss, V. Meyer, E. C. Böttger and M. Hombach, 2014, Evaluation of the AID ESBL line probe assay for rapid detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and KPC carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 69, 85-90.

Bonnet, R., 2004, Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1-14.

Borjesson, S., B. Bengtsson, C. Jernberg and S. Englund, 2013, Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incI* plasmid carrying *bla*(CTX-M-1). *Acta Vet Scand* 55, 3.

Boucher, H., L. G. Miller and R. R. Razonable, 2010, Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 51 Suppl 2, S183-197.

Bush, K., G. A. Jacoby and A. A. Medeiros, 1995, A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1211-1233.

Carmeli, Y., 2011, The effects of group 1 versus group 2 carbapenems on imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an ecological study ☆. 70, 367–372.

Carmo, L. P., L. R. Nielsen, P. M. da Costa and L. Alban, 2014, Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark. *Infect Ecol Epidemiol* 4.

Chisholm, S. A., J. W. Mouton, D. A. Lewis, T. Nichols, C. A. Ison and D. M. Livermore, 2010, Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J Antimicrob Chemother* 65, 2141-2148.

Collins, V. L., D. Marchaim, J. M. Pogue, J. Moshos, S. Bheemreddy, B. Sunkara, A. Shallal, N. Chugh, S. Eiseler, P. Bhargava, C. Blunden, P. R. Lephart, B. I. Memon, K. Hayakawa, O. Abreu-Lanfranco, T. Chopra, L. S. Munoz-Price, Y. Carmeli and K. S. Kaye, 2012, Efficacy of ertapenem for treatment of bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2173-2177.

Datta, N. and P. Kontomichalou, 1965, Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 208, 239-241.

Dierikx, C. M., J. A. van der Goot, H. E. Smith, A. Kant and D. J. Mevius, 2013, Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One* 8, e79005.

ECDC, 2015, Surveillance Report. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf> (Zugriffsdatum: 05.12.2016).

ECDC, 2016, Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-risk-assessment-april-2016.pdf> (Zugriffsdatum: 07.12.2016).

ECDC/EMA, 2009, Joint technical report. The bacterial challenge: time to react—a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf (Zugriffsdatum: 05.12.2016).

Endimiani, A., A. Rossano, D. Kunz, G. Overesch and V. Perreten, 2012, First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73, 31-38.

Friese, A., J. Schulz, H. Laube, C. von Salviati, J. Hartung and U. Roesler, 2013, Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 126, 175-180.

Färber, J., K. A. Moder, F. Layer, I. Tammer, W. König and B. König, 2008, Extended-spectrum Beta-lactamase detection with different panels for automated susceptibility testing and with a chromogenic medium. *J Clin Microbiol* 46, 3721-3727.

Gavin, P. J., M. T. Suseno, R. B. Thomson, Jr., J. M. Gaydos, C. L. Pierson, D. C. Halstead, J. Aslanzadeh, S. Brecher, C. Rotstein, S. E. Brossette and L. R. Peterson, 2006, Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin-tazobactam against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2244-2247.

Geser, N., R. Stephan and H. Hachler, 2012, Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* 8, 21.

Glupczynski, Y., C. Berhin, C. Bauraing and P. Bogaerts, 2007, Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 45, 501-505.

Guenther, S., C. Ewers and L. H. Wieler, 2011, Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol* 2, 246.

Hansen, K. H., P. Damborg, M. Andreassen, S. S. Nielsen and L. Guardabassi, 2013, Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 79, 794-798.

Hartmann, A., A. Locatelli, L. Amoureux, G. Depret, C. Jolivet, E. Gueneau and C. Neuwirth, 2012, Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Front Microbiol* 3, 83.

Hille, K., J. Fischer, L. Falgenhauer, H. Sharp, G. M. Brenner, K. Kadlec, A. Friese, S. Schwarz, C. Imirzalioglu, M. Kietzmann, C. Von Munchhausen and L. Kreienbrock, 2014, [On the occurrence of extended-spectrum- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in livestock: results of selected European studies]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127, 403-411.

Horton, R. A., L. P. Randall, E. L. Snary, H. Cockrem, S. Lotz, H. Wearing, D. Duncan, A. Rabie, I. McLaren, E. Watson, R. M. La Ragione and N. G. Coldham, 2011, Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol* 77, 3715-3719.

Johnson, P. D., S. A. Ballard, E. A. Grabsch, T. P. Stinear, T. Seemann, H. L. Young, M. L. Grayson and B. P. Howden, 2010, A sustained hospital outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia due to emergence of vanB *E. faecium* sequence type 203. *J Infect Dis* 202, 1278-1286.

Jørgensen, C. J., L. M. Cavaco, H. Hasman, H. D. Emborg and L. Guardabassi, 2007, Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *J Antimicrob Chemother* 59, 1040-1042.

Kang, C. I., J. H. Song, D. R. Chung, K. R. Peck, K. S. Ko, J. S. Yeom, H. K. Ki, J. S. Son, S. S. Lee, Y. S. Kim, S. I. Jung, S. W. Kim, H. H. Chang, S. Y. Ryu, K. T. Kwon, H. Lee, C. Moon and S. Y. Shin, 2010, Risk factors and treatment outcomes of community-onset bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 36, 284-287.

Kasuga, E., T. Matsumoto, E. Hidaka, H. Oguchi, S. Kanai, K. Oana, K. Yamauchi, T. Honda and Y. Kawakami, 2009, [Clinical assessment of novel ChromID ESBL agar plates for detection of ESBL producers in the family Enterobacteriaceae]. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* 20, 1-8.

Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. Meyer, R. M. Tolxdorff-Neutzling and B. Wiedemann, 1985, Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 28, 302-307.

Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal and S. Mitsuhashi, 1983, Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11, 315-317.

Koo, S. H., K. C. Kwon, H. H. Cho and J. Y. Sung, 2010, Genetic basis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. *Korean J Lab Med* 30, 498-506.

Kumarasamy, K. K., M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A. V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D. L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J. B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M. A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D. M. Livermore and N. Woodford, 2010, Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10, 597-602.

Leclercq, R., R. Cantón, D. F. Brown, C. G. Giske, P. Heisig, A. P. MacGowan, J. W. Mouton, P. Nordmann, A. C. Rodloff, G. M. Rossolini, C. J. Soussy, M. Steinbakk, T. G. Winstanley and G. Kahlmeter, 2013, EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19, 141-160.

Leistner, R., S. Gurntke, C. Sakellariou, L. A. Denkel, A. Bloch, P. Gastmeier and F. Schwab, 2014, Bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: an analysis of the disease burden in a large cohort. *Infection* 42, 991-997.

Leverstein-van Hall, M. A., A. C. Fluit, A. Paauw, A. T. Box, S. Brisse and J. Verhoef, 2002, Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 40, 3703-3711.

Li, J., Y. Ma, C. Hu, S. Jin, Q. Zhang, H. Ding, L. Ran and S. Cui, 2010, Dissemination of cefotaxime-M-producing *Escherichia coli* isolates in poultry farms, but not swine farms, in China. *Foodborne Pathog Dis* 7, 1387-1392.

Livermore, D. M. and N. Woodford, 2006, The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 14, 413-420.

Melzer, M. and I. Petersen, 2007, Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect* 55, 254-259.

Menozzi, M. G., U. Eigner, S. Covan, S. Rossi, P. Somenzi, G. Dettori, C. Chezzi and A. M. Fahr, 2006, Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 44, 4085-4094.

Mollenkopf, D. F., J. M. Mirecki, J. B. Daniels, J. A. Funk, S. C. Henry, G. E. Hansen, P. R. Davies, T. S. Donovan and T. E. Wittum, 2013, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M cephalosporinase from swine finishing barns and their association with antimicrobial use. *Appl Environ Microbiol* 79, 1052-1054.

Morosini, M. I., M. Garcia-Castillo, M. Tato, D. Gijon, A. Valverde, P. Ruiz-Garbajosa and R. Canton, 2014, Rapid detection of beta-lactamase-hydrolyzing extended-spectrum cephalosporins in Enterobacteriaceae by use of the new chromogenic betaLacta test. *J Clin Microbiol* 52, 1741-1744.

Nguyen, H. M., K. L. Shier and C. J. Graber, 2014, Determining a clinical framework for use of cefepime and beta-lactam/beta-lactamase inhibitors in the treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 69, 871-880.

Paterson, D. L., 2006, Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med* 119, S20-28; discussion S62-70.

Perron, A., P. Raymond and R. Simard, 2006, The occurrence of antibiotic resistance genes in Taq polymerases and a decontamination method applied to the detection of genetically modified crops. *Biotechnol Lett* 28, 321-325.

Pfeifer, Y. and C. Eller, 2012, Aktuelle Daten und Trends zur β -Lactam-Resistenz bei gramnegativen Infektionserregern. 55, 1405-1409.

Philippon, A., G. Arlet and G. A. Jacoby, 2002, Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1-11.

Poole, K., 2004, Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10, 12-26.

Reist, M., N. Geser, H. Hachler, S. Scharrer and R. Stephan, 2013, ESBL-producing Enterobacteriaceae: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. *PLoS One* 8, e71725.

Renvoise, A., D. Decre, R. Amarsy-Guerle, T. D. Huang, C. Jost, I. Podglajen, L. Raskine, N. Genel, P. Bogaerts, V. Jarlier and G. Arlet, 2013, Evaluation of the betaLacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 51, 4012-4017.

RKI, 2007, ESBL und AmpC: Beta-Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien.

https://http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Erreger_ausgewaehlt/ESBL/ESBL_28_07.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 08.12.2016).

Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, M. de Cueto, M. J. Rios, J. R. Hernandez and A. Pascual, 2006, Bacteremia due to extended-spectrum beta - lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 43, 1407-1414.

Schmid, A., S. Hormansdorfer, U. Messelhauser, A. Kasbohrer, C. Sauter-Louis and R. Mansfeld, 2013, Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol* 79, 3027-3032.

Schmithausen, R. M., S. V. Schulze-Geisthoevel, F. Stemmer, M. El-Jade, M. Reif, S. Hack, A. Meilaender, G. Montabauer, R. Fimmers, M. Parcina, A. Hoerauf, M. Exner, B. Petersen, G. Bierbaum and I. Bekeredjian-Ding, 2015, Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among Pigs and Farm Personnel. *PLoS One* 10, e0138173.

Sharp, H., L. Valentin, J. Fischer, B. Guerra, B. Appel and A. Kasbohrer, 2014, [Estimation of the transfer of ESBL-producing *Escherichia coli* to humans in Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127, 464-477.

Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, B. Catry, L. Herman, F. Haesebrouck and P. Butaye, 2008, Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1238-1243.

Snow, L. C., R. G. Warner, T. Cheney, H. Wearing, M. Stokes, K. Harris, C. J. Teale and N. G. Coldham, 2012, Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev Vet Med* 106, 225-234.

Song, J. S., J. H. Lee, B. C. Jeong, W. K. Lee and S. H. Lee, 2006, Removal of contaminating TEM-la beta-lactamase gene from commercial Taq DNA polymerase. *J Microbiol* 44, 126-128.

SWEDRES-SVARM, 2013, Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden 2012.

http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm2013.pdf

(Zugriffsdatum: 08.12.2016).

Thomson, K. S., 2010, Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 48, 1019-1025.

Thomson, K. S., N. E. Cornish, S. G. Hong, K. Hemrick, C. Herdt and E. S. Moland, 2007, Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum-beta-lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 45, 2380-2384.

Uma, B., K. Prabhakar, S. Rajendran and Y. Lakshmi Sarayu, 2010, Prevalence of extended spectrum beta lactamases in *Salmonella* species isolated from patients with acute gastroenteritis. *Indian J Gastroenterol* 29, 201-204.

Usui, M., T. Iwasa, A. Fukuda, T. Sato, T. Okubo and Y. Tamura, 2013, The role of flies in spreading the extended-spectrum beta-lactamase gene from cattle. *Microb Drug Resist* 19, 415-420.

Valenza, G., S. Muller, C. Schmitt, D. Turnwald, T. T. Lam, M. Frosch, M. Abele-Horn and Y. Pfeifer, 2011, Evaluation of the VITEK 2 AST-N111 card for detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* compared to ESBL Etests and combination disk methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30, 869-872.

van Hal, S. J., D. L. Paterson and I. B. Gosbell, 2011, Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient--a review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30, 603-610.

Vardakas, K. Z., G. S. Tansarli, P. I. Rafailidis and M. E. Falagas, 2012, Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 67, 2793-2803.

Wang, J. T., S. C. Chang, F. Y. Chang, C. P. Fung, Y. C. Chuang, Y. S. Chen, Y. R. Shiao, M. C. Tan, H. Y. Wang, J. F. Lai, I. W. Huang and T. L. Yang Lauderdale, 2015, Antimicrobial Non-Susceptibility of *Escherichia coli* from Outpatients and Patients Visiting Emergency Rooms in Taiwan. *PLoS One* 10, e0144103.

Wasył, D., H. Hasman, L. M. Cavaco and F. M. Aarestrup, 2012, Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic *Escherichia coli* from food-producing animals slaughtered in Poland. *Microb Drug Resist* 18, 79-82.

WHO, 2014, Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
 (Zugriffsdatum: 07.12.2016).

Wiegand, I., 2003, Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Laktam-Resistenz durch Beta-Laktamasen. *Chemother J* 12, 151–167.

Wiegand, I., H. K. Geiss, D. Mack, E. Sturenburg and H. Seifert, 2007, Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 45, 1167-1174.

Wu, S., E. Chouliara, H. Hasman, A. Dalsgaard, A. Vieira and L. B. Jensen, 2008, Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark. *J Antimicrob Chemother* 61, 747-749.

Zurfluh, K., H. Hachler, M. Nuesch-Inderbinen and R. Stephan, 2013, Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 79, 3021-3026.

8. Danksagung

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding für die Überlassung des interessanten Themas mit aktuellem Bezug und die hervorragende Betreuung.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern der AG Ding am IMMIP für die herzliche Aufnahme, das sehr gute Arbeitsklima und für Ihre Hilfe und Unterstützung.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Diagnostik des IMMIP für ihre fachliche und materielle Hilfsbereitschaft.